

Universidade de Lisboa

Faculdade de Farmácia



**Inibidores da aromatase e esteróide
sulfatase no tratamento do cancro da
mama**

Joana Isabel Belo de Sousa e Araújo Meira

Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

2017

**Universidade de Lisboa
Faculdade de Farmácia**



Inibidores da aromatase e esteróide sulfatase no tratamento do cancro da mama

Joana Isabel Belo de Sousa e Araújo Meira

**Monografia de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas
apresentada à Universidade de Lisboa através da Faculdade de
Farmácia**

Orientador: Professora Doutora Ana Paula Gameiro Francisco

2017

Resumo

O cancro da mama continua a ser uma das principais causas de morte nas mulheres em todo o mundo, sendo que atualmente o tratamento endócrino possui um alto valor terapêutico em doentes com cancro da mama recetor de estrogénios positivo (RE+). Os estrogénios têm um papel muito importante no normal crescimento e desenvolvimento de vários tecidos, no entanto, também são responsáveis pelo crescimento dos tecidos neoplásicos, sendo a sua ação mediada através dos RE.

O objetivo central do tratamento hormonal atual do cancro da mama passa por duas estratégias principais: diminuição da produção de estrogénios ou o bloqueio da ação dos mesmos ao nível dos RE. Assim, existem várias abordagens terapêuticas, nomeadamente os moduladores seletivos dos recetores de estrogénio (SERMs) como é exemplo o tamoxifeno, e os inativadores (SERDs) como o fulvestran, que atuam diretamente nos RE ou os inibidores da biossíntese dos esteróides como é o caso dos inibidores da aromatase (IAs), como o Anastrozol, Letrozol e Exemestano ou, mais recentemente, os inibidores da esteróide sulfatase (STS). Ambas as enzimas são responsáveis por passos da biossíntese do estrogénio, logo a sua inibição trará bastantes benefícios para os doentes.

Devido à melhor eficácia, potência e perfil de toxicidade, os IAs têm vindo a substituir o tamoxifeno, considerado como *gold standard* durante várias décadas, nas mulheres pós-menopausa. No entanto, tal como as terapias anteriores, também estes podem apresentar resistências de novo ou adquirida, bem como efeitos secundários, o que justifica a pesquisa de novos compostos.

Nesta revisão será abordado o potencial terapêutico dos IAs, assim como de compostos inibidores da STS. Estes últimos ainda se encontram em fase de desenvolvimento, tendo o Irosustat já entrado em dois ensaios clínicos, onde obteve resultados promissores. Não obstante, o futuro da terapêutica hormonal poderá passar por uma possível abordagem *multitarget* numa única molécula.

Palavras-chave: Cancro da Mama; Terapia endócrina; Inibidores da Aromatase; Inibidores da Esteróide Sulfatase; Inibidores duplos

Abstract

Breast cancer continues to be one of the major causes of death in women all over the world, and currently endocrine treatment is of major therapeutic value in patients with estrogen receptor positive tumors. Estrogens have an imperative role in the growth and development of normal tissue, but, they are also responsible for the growth of neoplastic tissue. Estrogen action is mediated via estrogen receptors (ER).

Nowadays, the hormone therapy in breast cancer has two major strategies: decline of estrogen production or blockade of its action in the ER. Thereby, there are several therapeutic approaches, in particular the selective estrogen receptor modulator (SERMs) like tamoxifen, or the downregulators (SERDs) like fulvestran, which act directly in the ER, the aromatase inhibitors (AIs), such as Anastrozole, Letrozole and Exemestane, or more recently, the steroid sulfatase inhibitors (STSI). Both enzymes are responsible for steps in the estrogen biosynthesis, therefore their inhibition will bring plenty of benefits to patients.

Due to a better efficacy, potency and toxicity profile, the AIs have replaced tamoxifen, considered as gold standard for decades in postmenopausal women. However, just like previous therapies, AIs could also report *de novo* or acquired resistances as well as adverse effects, which justifies the search for new drugs.

In this review, it will be addressed the therapeutic potential from AIs, as well as STSI inhibitors. The last ones are still in development, having already entered in a clinical trial, with promising output. Nonetheless, the future of hormone therapy could go through a multitarget approach in a single drug.

Keywords: Breast Cancer; Endocrine Therapy; Aromatase Inhibitors; Steroid Sulfatase Inhibitors; Dual Inhibitors

Abreviaturas

17 β -HSD1 - 17 β -hidroxiesteróide desidrogenase

AF1/AF2 - Funções de ativação de transcrição dos RE

BRCA1/BRCA2 - Gene *breast cancer 1 e 2*

CPR - Redutase do citocromo P450

DASI – *Dual aromatase-sulfatase inhibitors*

DFS - *disease-free-survival*

DHEA – Di-hidroepiandrostenona

DHEAS - Sulfato-di-hidroepiandrostenona (DHEAS),

E1 - Estrona

E2 – Estradiol

E3 – Estriol

EGFR - Recetor do fator de crescimento epidérmico

EMATE - E1-3-O-sulfamato

E2MATE - E2-3-O-sulfamato

ERE - *Estrogen response elements*

E1S - Sulfato de estrona

FACE - *The Letrozole Femara Versus Anastrozole Clinical Evaluation*

FGly - *Formilglycine*

FSH - Hormona folículo-estimulante

Gn-RH - Hormona gonadotrofina

IA - Inibidor da aromatase

IGF-1R - recetor 1 do fator de crescimento tipo insulina

LH - hormona luteinizante

MISS - *Membrane initiated steroid signaling*

NISS - *Nuclear initiated steroid signaling*

OS - *overall survival and safety*

SERDs - *selective estrogen receptor downregulators*

SERMs - *Selective estrogen receptor modulators*

STS - Sulfatase esteróide

RA - Recetor dos androgénios

RE - Recetor de Estrogénios

RE α - Recetor de Estrogénios α

RE β - Recetor de Estrogénios β

ROS -Espécies reativas de oxigénio

Índice:

1. Introdução	1
1.1. Cancro da Mama no Mundo: Incidência e Fatores de Risco	1
1.2. Importância do estrogénio no Cancro da Mama.....	3
1.3. Recetores de estrogénios e vias de sinalização intracelular	4
1.4. Estratégias terapêuticas na terapia endócrina do Cancro da Mama	6
1.4.1. Moduladores e inativadores seletivos dos recetores de estrogénio (SERMs e SERDs)	7
1.5. Efeitos da terapia hormonal na proliferação e morte celular.....	9
Objetivos	11
2. Materiais e Métodos	12
3. Aromatase – importância no cancro da mama.....	13
3.1. Inibidores da Aromatase	16
3.1.1. Inibidores não esteroides da aromatase.....	19
3.1.2. Inibidores esteróides da aromatase.....	21
4. Esteróide Sulfatase – Importância no cancro da mama.....	24
4.1. Inibidores da Esteróide Sulfatase.....	26
4.1.1. STX64/ 667 Coumate/ Irosustat	27
4.1.2. STX 213 e STX1938	28
4.1.3. KW-2581	29
5. Limitações e perspectivas futuras	31
5.1. Inibidores duplos da aromatase e esteróide sulfatase.....	31
5.2. Inibidores duplos da STS e moduladores seletivos dos recetores de estrogénio	33
5.3. Inibidores duplos da 17 β -HSD1 e STS	34
6. Conclusões e Discussão	35
Referências Bibliográficas.....	37

Índice de Figuras:

Figura 1 - Incidência do Cancro da mama (por 100,000) em função da idade.....	1
Figura 2 - Biossíntese de estrogénios a partir do colesterol	4
Figura 3 – Vias Genómica e não Genómica de sinalização dos estrogénios	6
Figura 4 - Estruturas químicas de compostos anti-estrogénio - Estruturas químicas do tamoxifeno; SERM tipo tamoxifeno - toremifeno; SERM de anel fixo – raloxifeno; SERD – fulvestran	8
Figura 5 - Biossíntese de estrogénios pela aromatase	14
Figura 6 – Demonstração esquemática do modelo do complexo CPR-aromatase. NADP (roxo), FMN (laranja), heme (vermelho) e androstenediona (ciano). O resíduo K108 (azul) está localizado na hélix B' (verde) da aromatase e desempenha um papel importante na interação entre a CPR e aromatase e na transferência de eletrões.	15
Figura 7 – Modelo de docking do complexo aromatase-letrozol. (A) Letrozol (ciano). (B) Quinze aminoácidos (castanho claro). Os resíduos F221, W224 e F374 estão a laranja, azul e magenta respectivamente. (C) Aromatase-Letrozol. (D) Aromatase-Exemestano (roxo).	16
Figura 8 - Estruturas químicas dos inibidores não esteróides da aromatase – Fadrozol e Vorozol (2 ^a geração); Anastrozol e Letrozol (3 ^a geração)	19
Figura 9 - Locais de ação dos diferentes IAs – (1) – IAs de Primeira Geração (aminoglutetímida); (2) – IAs de Segunda geração (fadrozol); (3) – IAs de Terceira Geração (anastrozol e letrozol).....	20
Figura 10 - Estruturas químicas do substrato da aromatase e dos inibidores da aromatase esteróides	22
Figura 11 - Mecanismo de ação da enzima sulfatase esteróide	25
Figura 12 - Estruturas químicas de alguns dos inibidores da STS desenvolvidos ...	27
Figura 13 - Estruturas químicas de DASI	32
Figura 14 - Estrutura química do STX681 – DASI	33
Figura 15 - Estrutura química dos compostos SR16157 e SR1637	34
Figura 16 - Estrutura química do inibidor duplo de 17 β -HSD1 e STS	34

Índice de Tabelas:

Tabela 1 - Fatores de Risco para o cancro da mama	3
Tabela 2 - Classificação cronológica e segundo o mecanismo de ação dos inibidores da aromatase	17
Tabela 3 - Potência de inibição da aromatase pelas 3 gerações de IAs	20

1. Introdução

1.1. Cancro da Mama no Mundo: Incidência e Fatores de Risco

O cancro da mama é atualmente uma das doenças com maior impacto na sociedade, não só pela sua gravidade e incidência, mas porque está envolvido um órgão cheio de simbolismo na maternidade e feminilidade da mulher. Este é a segunda forma de cancro mais comum no mundo e a mais frequente nas mulheres, por uma larga margem, com uma estimativa de 1,7 milhões de novos casos em 2012, cerca de 25% de todos os cancros (de acordo com os dados mais recentes disponíveis) (1). É a maior causa de morte relacionada com cancro nas mulheres, tanto em países desenvolvidos como em desenvolvimento, afetando 10-12% da população feminina, estimando-se cerca de 571 000 mortes por ano em todo o mundo (2).

Em Portugal, segundo a Direção Geral de Saúde também é o tumor mais frequente nas mulheres, tendo uma taxa de incidência de 118,5 em 100000 habitantes em 2010 e contando com 1683 óbitos em 2015 (3). Nos últimos anos, especialmente desde 1990, tem-se observado uma diminuição nas percentagens de mortalidade por cancro da mama em países desenvolvidos. Isto poderá ser justificado pelos avanços no diagnóstico e tratamento, o que permitiu não só uma maior compreensão sobre a doença, bem como o desenvolvimento de novas terapêuticas e o aumento da frequência de deteção precoce (4).

São vários os fatores que contribuem para aumentar o risco de aparecimento do cancro da mama (Tabela 1). A idade e o sexo são dois dos maiores fatores de risco, sendo maior no sexo feminino e com o avançar da idade, como podemos observar na Figura 1 (5).

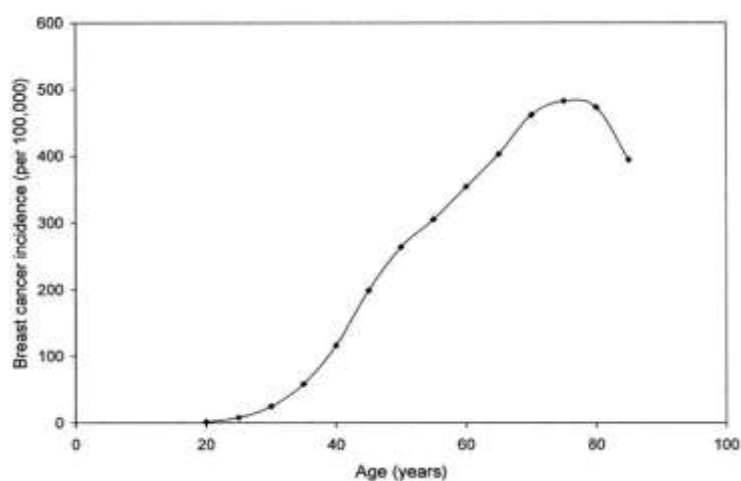


Figura 1 - Incidência do Cancro da mama (por 100,000) em função da idade (retirado de (5))

Além destes também os fatores hereditários se apresentam como bastante relevantes. Foi no início dos anos 90, que estudos genéticos mostraram que o risco de cancro da mama hereditário estaria interligado com o cromossoma 17q21. Esta descoberta culminou com a identificação de 2 genes. Em 1994, Mark Skolnick e a sua equipa, identificaram o gene *breast cancer 1 (BRCA1)* e um ano mais tarde, em 1995, Mike Stratton e a sua equipa identificaram o gene *breast cancer 2 (BRCA2)*, no cromossoma 13q12.3. Ambas as descobertas foram importantes para concluir que uma mutação nos genes respetivos, estaria associada ao cancro da mama hereditário e consequentemente conferia um maior risco para a mulher (6). Estes são genes supressores de tumores, estando envolvidos em vários processos celulares essenciais, tais como reparação de erros do *DNA* tendo assim um papel importante em assegurar a estabilidade dos cromossomas, bem como manter o curso adequado do ciclo celular e da apoptose (7).

Fatores hormonais que aumentam a exposição a estrogénios, tais como, idade precoce da menarca, menopausa tardia, primeira gravidez tardia ou não ter filhos bem como terapia de substituição hormonal, limitada ao uso combinado de estrogénios e progesterona, contribuem também para um aumento do risco.

Pelo contrário, pensa-se que a adoção de um estilo de vida saudável, com a prática regular de exercício físico e a manutenção de um peso corporal estável, bem como a gravidez e amamentação estejam associados a uma diminuição da incidência de cancro da mama (8).

Tabela 1 - Fatores de Risco para o cancro da mama (adaptado de (77))

	Risco Relativo	Grupo de Alto Risco
Idade	>10	Indivíduos com uma certa idade
Localização Geográfica	5	Países desenvolvidos
Densidade da mama	>5	Tecido mamário extensivamente denso, visível em mamografias
Idade da menarca	3	Antes dos 11 anos
Idade da menopausa	2	Depois dos 54 anos
Idade da primeira gravidez	3	Primeiro filho depois dos 40 anos
Historial familiar	>2	Cancro da mama em primeiro grau relativo
Antecedentes de tumores de mama benignos	4-5	Hiperplasia atípica
Cancro na outra mama	>4	Antecedente de cancro da mama
Grupo socioeconómico	2	Grupos de baixo e alto status socioeconómico
Índice de massa corporal (IMC)		
Pré-menopausa	0,7	Elevado IMC
Pós-menopausa	2	Elevado IMC
Consumo de álcool	1,07	Aumento de 7% por cada bebida diária
Exposição a radiação	3	Exposição anormal em raparigas depois dos 10 anos
Amamentação e paridade	O risco decresce para os 4-3% para os 12 meses de amamentação, em adição a uma redução de 7% por cada nascimento	Mulheres que amamentam
Utilização de hormonas exógenas		
Contracetivos orais	1,2	Utilizadores correntes
Terapia de substituição hormonal	1,66	Utilizadores correntes

1.2. Importância do estrogénio no Cancro da Mama

Os estrogénios controlam múltiplos processos fisiológicos tendo como principal função, o crescimento, diferenciação e manutenção do sistema reprodutivo, uma vez que são reconhecidos como hormonas sexuais femininas. Outros papéis atribuídos aos estrogénios incluem o crescimento e manutenção dos ossos e o normal funcionamento tanto do sistema cardiovascular como do sistema nervoso central. No caso de cancro da mama, o papel destes também já está bem identificado. São três os grandes mecanismos envolvidos nos seus efeitos carcinogénicos: ligação do estradiol (E2) ao recetor de estrogénios (RE) que estimula a transcrição de genes envolvidos na proliferação celular, podendo atuar na iniciação ou na promoção do cancro da mama; efeitos genotóxicos que provocam a formação de adutos de DNA, induzindo o aumento do número de mutações no citocromo P450 e indução da aneuploidia (9).

Nas mulheres, os estrogénios são biosintetizados em diferentes órgãos antes e depois da menopausa. Na pré-menopausa, os ovários são a principal fonte de estrogénios circulantes. No entanto, na pós-menopausa, a maior parte dos estrogénios são sintetizados nos tecidos periféricos, através da conversão de androgénios inativos na circulação, uma vez que a formação nos ovários cessa. Apesar da quantidade de estrogénios sintetizada ser mais baixa nesta fase, as concentrações locais estragonodais, são um fator determinante na incidência do cancro da mama, estimulando assim as células cancerígenas da mama (10).

A síntese de estrogénios inicia-se a partir da molécula de colesterol sendo controlada por várias enzimas altamente seletivas, culminando na formação de três principais formas de estrogénio: Estrona (E1), 17 β Estradiol (E2) e Estriol (E3) (Figura 2). E2 é o principal produto de todo o processo de biossíntese e o mais potente durante o período pré-menopausa da mulher, enquanto que o E1 é mais importante na fase pós-menopausa (11). Os androgénios mais importantes são a androstenediona, a dihidroepiandrostenona (DHEA) e a sulfato-dihidroepiandrostenona (DHEAS), responsáveis por 50% de todos os androgénios nos homens, e 75% dos estrogénios nos tecidos periféricos (12). As hormonas DHEA e DHEAS estão presentes na circulação numa concentração superior à encontrada para as hormonas sexuais esteróides ativas, compondo assim um reservatório de precursores que estão disponíveis para a conversão em estrogénio em inúmeros locais periféricos (13)(14).

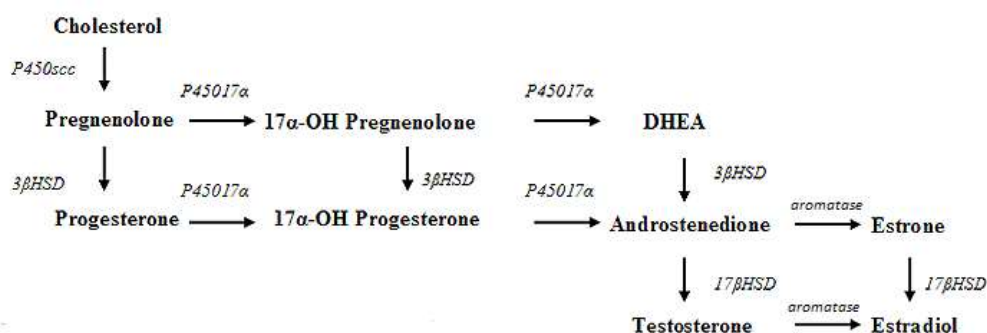


Figura 2 - Biossíntese de estrogénios a partir do colesterol (retirado de (78))

1.3. Recetores de estrogénios e vias de sinalização intracelular

Os estrogénios e os recetores de estrogénios desempenham um papel crucial no desenvolvimento, proliferação, diferenciação e apoptose das células epiteliais da mama. Para além disso, sabe-se que uma desregulação dos RE está associada à iniciação e desenvolvimento do cancro da mama (15). A sua expressão é importante para averiguar a resposta à terapia endócrina. Hoje em dia, as terapias endócrinas

para cancros da mama RE positivos visam afetar a função dos RE em múltiplos níveis, incluindo reduzir o nível de estrogénios, bloquear a ação dos estrogénios nos RE e diminuir os níveis de RE (16).

Foram identificadas duas isoformas dos RE, o recetor de estrogénios α (RE α) e o recetor de estrogénios β (RE β), transcritos por genes diferentes localizados em diferentes cromossomas. O RE α está localizado no cromossoma 6 enquanto que o RE β está no cromossoma 14 (17). Apesar de apresentarem uma elevada homologia a nível do domínio de ligação ao DNA – ligando, sofreram uma divergência evolutiva, tendo papéis bem distintos na regularização da expressão de genes, mais precisamente efeitos antagonistas. (18).

Enquanto que o RE α medeia a proliferação celular desregulada nas células do cancro da mama, o RE β opõe-se à ação do RE α , antagonizando a ação dos mesmos, através da redução da migração das células cancerígenas, atribuindo aos RE β um papel supressor tumoral. Evidências clínicas e experimentais sugerem então, que o RE α é o fator principal envolvido no desenvolvimento da maioria dos cancros da mama (15).

As vias de sinalização dos estrogénios incluem dois mecanismos distintos: genómico e não genómico (Fig.3). A via genómica, também denominada por *nuclear initiated steroid signaling* (NISS), é iniciada quando se estabelece a ligação do estrogénio ao recetor no núcleo, induzindo uma mudança conformacional nos recetores que causa a dissociação, dimerização e ativação do domínio transcripcional do recetor. Esta pode ocorrer segundo duas formas, clássica (direta) e não-clássica. Na clássica, o RE ativado liga, na forma de dímero e na presença de co-ativadores, a uma sequência específica de DNA, *estrogen response elements* (ERE), localizado na região promotora de genes regulados pelo estrogénio que conduzem ao crescimento e progressão do cancro da mama. Por outro lado, os RE podem afetar a transcrição de genes que não tenham a sequência ERE, através de interações proteína-proteína com outros fatores de transcrição (Fos e JUN) que se ligam a diferentes sequências de DNA, designada por forma não-clássica.

A via de sinalização pode também ocorrer na membrana de uma forma mais rápida que no núcleo, sendo inicialmente independente da transcrição de genes. Esta via é designada de não genómica ou *membrane initiated steroid signaling* (MISS) (19). Esta via de sinalização envolve vários eventos que incluem a mobilização de mensageiros secundários, interação com os recetores de membrana tais como recetor 1 do fator de crescimento tipo insulina – IGF-1R e recetor do fator de crescimento epidérmico – EGFR e estimulação de moléculas adaptadoras (20).

Os mecanismos de ação genómicos e não genómicos parecem ser complementares e mesmo sinérgicos. A coexistência de ambos e as propriedades cooperativas destas duas vias, podem ajudar a explicar o papel dominante das vias de sinalização dos RE no cancro da mama.

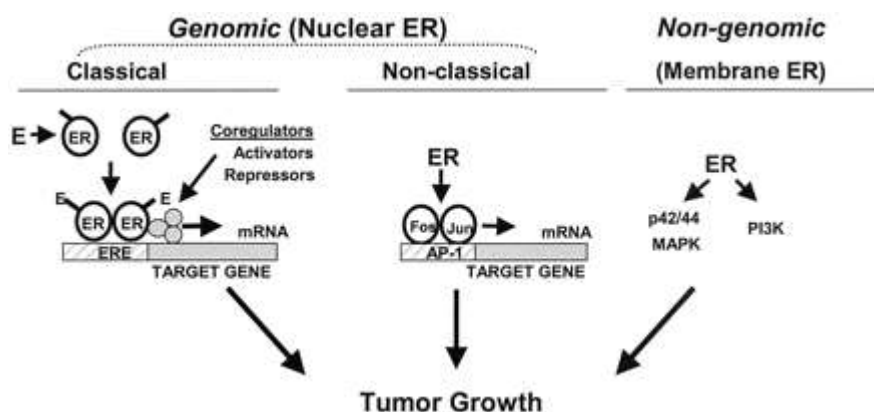


Figura 3 – Vias Genómica e não Genómica de sinalização dos estrogénios (retirado de (21))

1.4. Estratégias terapêuticas na terapia endócrina do Cancro da Mama

Os inúmeros avanços multidisciplinares no tratamento do cancro da mama (quimioterapia, terapia hormonal, cirurgia e radioterapia) têm permitido tratar os pacientes de uma forma individualizada adequando o melhor possível às características do tumor de cada utente, melhorando os *outcomes* e sem comprometer a qualidade de vida (22)

A terapia hormonal desempenha um papel importante no cancro da mama, mais especificamente quando direcionado aos estrogénios e RE, uma vez que se sabe que estes estão entre os fatores que mais se destacam na carcinogénese do cancro da mama, sendo assim fatores preditivos de resposta ao tratamento endócrino.

Mais de 70% dos casos de cancro da mama diagnosticados são RE positivos, tanto nos estadios mais iniciais como nos mais tardios. Nestes casos, torna-se uma mais valia para os pacientes, a implementação de uma terapia hormonal, sendo este o tratamento de escolha (23).

As terapias endócrinas atualmente utilizadas, incluem principalmente a diminuição da produção de estrogénios ou o bloqueio da ação dos mesmos ao nível dos RE. Estas podem ser classificadas pelo seu mecanismo de ação. A ablação dos ovários mostrou ser um tratamento efetivo há mais de 100 anos atrás, bem como a supressão das funções dos ovários com a utilização de um agonista da hormona

gonadotrofina (Gn-RH). Outras opções de tratamento passam pela utilização dos SERMs, *selective estrogen modulators* e dos SERDs *selective estrogen downregulators* que interferem com a capacidade do estrogénio se ligar ao seu recetor. Uma outra alternativa, é a utilização de inibidores da aromatase que bloqueiam a conversão dos androgénios em estrogénios, reduzindo os seus valores. A administração de doses elevadas de estrogénios, androgénios ou progestinas é também uma opção, sendo que alguns estudos sugerem que estas elevadas doses podem induzir a apoptose (24).

Apesar dos benefícios da terapia endócrina no tratamento do cancro da mama RE positivo e na qualidade de vida de milhões de pessoas nas últimas décadas, a sua efetividade é limitada, podendo ocorrer resistências (25). Essas resistências são normalmente de dois tipos, resistência de *novo* ou intrínseca quando não há resposta inicial à terapêutica e a resistência adquirida durante o tratamento, em que ocorreu uma resposta inicial (26). Alguns tumores perdem a dependência de estrogénios com a redução da expressão dos RE. Outros perdem a dependência de estrogénios enquanto continuam a expressar os RE. Evidências clínicas sugerem ainda que certos tumores apesar de resistentes a uma terapia específica podem ser sensíveis a outros tratamentos. Estes tumores acabarão por desenvolver resistência para os RE específicos da terapia.

Existe um elevado e distinto número de mecanismos descritos que têm sido implicados na resistência à terapia endócrina, sugerindo que é um processo complexo e que pode divergir de paciente para paciente. A compreensão destes mecanismos irá ajudar significativamente a desenvolver novas estratégias terapêuticas incluindo novos *targets* que irão ajudar a combater as resistências (25)

1.4.1. Moduladores e inativadores seletivos dos recetores de estrogénio (SERMs e SERDs)

Várias terapias endócrinas possuem diferentes mecanismos para antagonizar os efeitos dos estrogénios a nível dos RE, usando dois tipos de compostos. Os moduladores seletivos dos recetores de estrogénios (SERMs), que são análogos do tamoxifeno (toremifeno, droloxifeno, idoxifeno) ou de anel fixo (raloxifeno e arzoxifeno) e os inativadores seletivos dos recetores de estrogénios (SERDs) de que é exemplo o fulvestran (fig.4). Os SERMs são conhecidos por estimular as ações estrogénicas (agonista dos RE) em tecidos, tais como ossos, fígado e sistema cardiovascular, mas exercem um efeito antagonista noutros locais, onde a estimulação dos estrogénios é considerada como indesejável, tal como na mama e útero (17). Esta atividade agonista

ou antagonista causa mudanças conformacionais diferentes nos recetores, resultando na ativação ou repressão dos genes alvos dos estrogénios. Nos últimos anos, uma procura por um antagonista puro sem atividade agonista e com uma atividade antagonista aumentada, levou à descoberta dos SERDs, que reduzem os níveis de RE nas células, através da sua destruição aquando da ligação (26). Um SERM ideal seria aquele que bloqueasse a ação dos estrogénios na mama e útero sem no entanto ter qualquer efeito estimulador nos mesmos tecidos, e que atuasse como agonista nos outros tecidos, como no osso, fígado, sistema cardiovascular e sistema nervoso central.

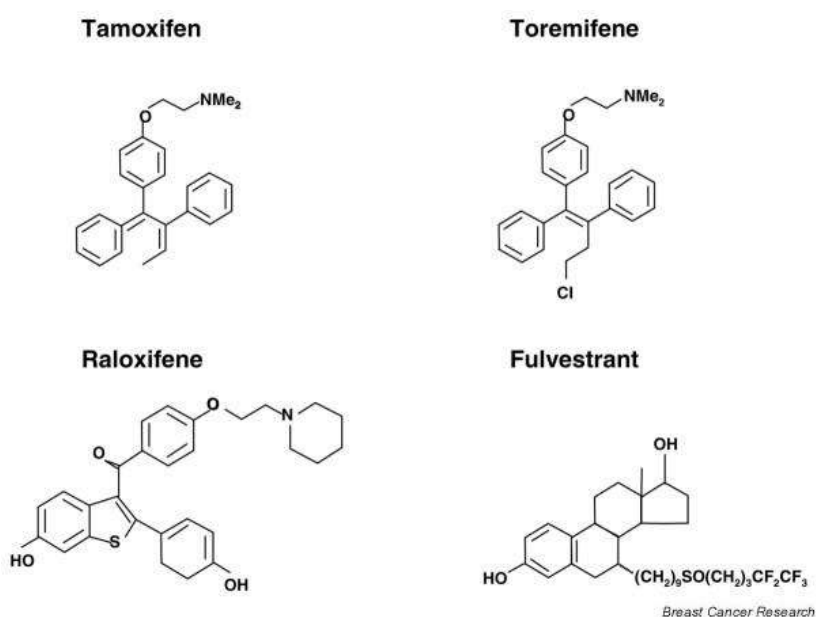


Figura 4 - Estruturas químicas de compostos anti-estrogénio - Estruturas químicas do tamoxifeno; SERM tipo tamoxifeno - toremifeno; SERM de anel fixo – raloxifeno; SERD – fulvestran (retirado de (79))

O tamoxifeno foi sintetizado inicialmente nos anos 60, pela Astra Zeneca, sendo aprovado em 1977 pela FDA e considerado durante mais de 20 anos como a terapia *standard*, apresentando atividade agonista e antagonista, ou seja, pode estimular ou inibir a função do RE dependendo do tecido ou gene em questão. Isto deve-se ao facto de o tamoxifeno apenas inibir uma das funções de ativação de transcrição dos RE, a AF2, explicando a atividade antagonista, ao passo que um efeito agonista é visível nos ossos, fígado e útero, que resulta da ativação do AF1 (27).

Inicialmente, o tamoxifeno foi aprovado para o tratamento de cancro da mama avançado, mostrando posteriormente que quando usado como terapia adjuvante poderia reduzir entre 30-50% a incidência do cancro da mama contra-lateral (28). No entanto, o uso a longo prazo (mais do que 5 anos) não é recomendado, uma vez que os efeitos benéficos diminuem e a toxicidade aumenta, bem como há uma maior

probabilidade de os pacientes poderem desenvolver resistência ao fármaco, pois este começa a exercer efeito agonista no tumor, piorando o prognóstico. A resistência *de novo* ou adquirida ao tamoxifeno acontece com muita frequência o que limita a sua eficácia e utilização.

A terapia prolongada com tamoxifeno tem vindo a ser associada com o aumento do risco de cancro do endométrio, embolia pulmonar, eventos tromboembólicos e cataratas bem como o risco de AVC. No entanto continua a ser o tratamento de escolha em mulheres em pré menopausa com cancro da mama RE positivo ou para a redução do risco em mulheres com elevado risco de desenvolver cancro da mama (28).

O raloxifeno apresenta um mecanismo semelhante ao do tamoxifeno mas aparenta exibir menos efeitos adversos, bem como uma maior atividade agonista no osso e menos no útero, o que justifica a sua utilização em quadros de osteoporose.

Mais recentemente, têm sido desenvolvidos antagonistas puros dos estrogénios, que não apresentam propriedades agonistas como é o caso do fulvestran, que se tornou o primeiro composto deste tipo, aprovado em 2002 (25). Este inibe o RE através da ligação competitiva com os estrogénios. Assim que ocorre a ligação, o fulvestran diminuiu a dimerização do recetor, provocando uma rápida degradação do RE e inibindo a transcrição (29).

O fulvestran tem vindo a demonstrar eficácia em pacientes nos quais a terapia com tamoxifeno falhou, para além de demonstrar ser mais potente, não exibindo propriedades agonistas. Isto deve-se ao fato de o fulvestran inibir a atividade de ambas as AF1 e AF2, bloqueando o recrutamento de co-ativadores e induzindo a destruição dos RE (25).

Relativamente a efeitos adversos, foram reportadas perturbações gastrointestinais, afrontamentos, aumento de peso, vaginites, astenia, náuseas e complicações tromboembólicas (30).

1.5. Efeitos da terapia hormonal na proliferação e morte celular

O desenvolvimento normal da mama é controlado pelo balanço entre a proliferação celular e a apoptose e existem evidências fortes de que o crescimento tumoral não é só resultado de uma proliferação descontrolada mas também de uma redução da apoptose (31).

Existem duas formas de reduzir a proliferação celular, quer através do bloqueio ou inibição do ciclo celular quer por indução da morte celular. Por sua vez, a morte de

células cancerígenas pode realizar-se, nomeadamente, por apoptose, necrose ou autofagia.

A apoptose é um processo de morte celular programado, tratando-se de um processo de indução da própria morte. Esta pode ocorrer segundo dois processos, o mitocondrial ou o dos recetores de morte. Nos humanos, as vias de apoptose são reguladas por famílias de multigenes, que são expressos individualmente em vários tecidos. Entre eles, a família *Bcl-2* que contém inibidores e promotores da apoptose e o gene supressor de tumores *p53*. Muitas das alterações, como condensação da cromatina, fragmentação nuclear, e alterações na assimetria dos fosfolípidos da membrana plasmática são resultado da atividade das chamadas caspases (31).

Um outro tipo de morte celular, é a autofagia. Este é um processo de digestão celular própria que tem como função eliminar os organelos danificados e reciclar macroproteínas, através do mecanismo de degradação lisossomal. Uma vez que esta pode promover tanto a sobrevivência como a morte celular, tem sido ligada a alguns cancros (32). Estudos têm demonstrado que a autofagia promove a sobrevivência do cancro por proteger as células de hipoxia, stress oxidativo e por causar resistência à quimioterapia (32). As proteínas ou organelos que foram identificados para destruição, são sequestrados por vesículas conhecidas como autofagossoma. Este depois funde-se com o lisossoma formando um complexo denominado por autolisossoma, sendo o seu conteúdo degradado por hidrolases lisossomais (32).

Alguns SERMs, como o tamoxifeno, e SERDs como o fulvestran, provocam morte celular por apoptose em células do cancro da mama. Existem também evidências de que o fulvestran e o raloxifeno, promovem a formação de espécies reativas de oxigénio (ROS), que estão associadas à libertação do citocromo c mitocondrial, que induz a apoptose pela via das caspases. Para além disso, ainda foi demonstrado que o tamoxifeno é capaz de induzir morte celular através de autofagia em células MCF-7 (33)(34).

Em relação aos inibidores da aromatase (IA), nomeadamente o exemestano, foi demonstrado que causa o bloqueio do ciclo celular na transição G0/G1 e diminui a viabilidade celular pela ativação da morte celular por apoptose pela via mitocondrial bem como a ocorrência de autofagia (35).

Assim sendo, perceber a relação entre proliferação e apoptose pode permitir a descoberta de tratamentos personalizados para maximizar a regressão do tumor e eficácia do tratamento. Pode ainda ajudar a perceber o porquê de alguns tumores não responderem às terapias e assim indicar novas rotas de desenvolvimento de compostos para promover a morte de células cancerígenas.

Objetivos

O objetivo desta monografia passa por identificar, descrever e analisar artigos científicos referentes à temática do cancro da mama, de forma a compreender quais os tratamentos usados atualmente, nomeadamente em relação aos inibidores da aromatase e da esteroide sulfatase, bem como perspetivas futuras. Assim, pretende-se responder a questões como: O que é a aromatase e a esteróide sulfatase? Quais os mecanismos de ação de ambas as enzimas? Quais os inibidores da aromatase e da esteróide sulfatase conhecidos e os respetivos mecanismos de ação? Quais os próximos passos a dar na descoberta de novos compostos para o tratamento do cancro da mama?

2. Materiais e Métodos

Os métodos utilizados para a redação da presente monografia foram, em primeiro lugar, a pesquisa de fundamentos teóricos sobre o Cancro da Mama, a sua incidência, história e fatores de risco, a importância do estrogénio e seus recetores, bem como as vias de sinalização e as terapias endócrinas existentes, seguida de pesquisa sobre os inibidores da aromatase e da sulfatase esteroide bem como possíveis lacunas na ação terapêutica dos já existentes ou perspectivas futuras no desenvolvimento de novos compostos.

Em segundo lugar e relativamente a toda a revisão de conteúdos científicos, a informação foi conseguida através de uma série de publicações disponibilizadas pelos motores de busca *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), com recurso à base de dados do *PubMed* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>), *Science Direct* (<http://www.sciencedirect.com/>) e *Google Scholar* (<https://scholar.google.pt/>).

A referida pesquisa bibliográfica foi realizada através das seguintes palavras-chave: “Breast Cancer”, “endocrine therapy”, “resistance”, “aromatase inhibitors”, “sulfatase steroid inhibitors”, “dual aromatase-sulfatase steroid inhibitors”, entre outros. Os referidos motores de busca, bases de dados e organizações são considerados fontes fidedignas e atualizadas, que garantem a qualidade da informação.

Em relação à pesquisa efetuada, não foi feita nenhuma restrição ao período de tempo, uma vez que é um tema debatido desde há vários anos, tendo, no entanto, dado preferência a artigos o mais recente possíveis.

*Monografia redigida de acordo com o novo acordo ortográfico.

3. Aromatase – importância no cancro da mama

A aromatase é a enzima limitante da biossíntese dos estrogénios, ao converter a androstenediona (secretada essencialmente no córtex adrenal) a estrona ou testosterona a estradiol. (36). É expressa pelo gene *CYP19A1* presente no cromossoma 15q21.1, e é constituído por um grupo heme e uma cadeia polipeptídica de 503 resíduos de aminoácidos (37). Está localizada no retículo endoplasmático das células que produzem estrogénios. O complexo enzimático da aromatase é constituído por dois polipéptidos, sendo o primeiro o citocromo P450 aromatase (P450arom) e o segundo uma flavoproteína, NADPH-citocromo P450 redutase. Uma vez que só um gene é que expressa a aromatase (*CYP19*), o bloqueio ou inibição deste gene elimina efetivamente a biossíntese de estrogénios (38).

No caso de mulheres pré-menopáusicas, as necessidades de estrogénios são satisfeitas essencialmente pela secreção pelos ovários. No entanto, em mulheres pós-menopáusicas, a síntese de estrogénio ocorre principalmente em tecidos periféricos que incluem a pele, o músculo, o tecido adiposo e no tecido cancerígeno, uma vez que a função no ovário cessa (39).

Este complexo enzimático é responsável pela conversão do androgénio esteroide C19 a estrogénio, através da aromatização da androstenediona, completando o último passo da biossíntese dos estrogénios. Enquanto que o P450arom é responsável pela ligação ao substrato esteroide C19 catalizando uma série de reações que levam à formação do anel fenólico característicos dos estrogénios, a NADPH-P-450 redutase, que é uma enzima ubiquitária presente no retículo endoplasmático de vários tipos de células, é responsável por transferir eletrões do NADPH para o grupo heme do citocromo P450arom (40).

O P450arom liga-se ao substrato do androgénio C19, a androstenediona e testosterona e cataliza as suas conversões a estrona e estradiol (41). A aromatização destes substratos, envolve três passos de hidroxilação consecutivos, cada um utilizando uma mole de NADPH e uma de O₂, convertendo o androgénio C19 em estrogénios C18. A primeira e a segunda, envolvem hidroxilações sucessivas do grupo metilo do C-19. A terceira oxidação leva à aromatização do anel A, através da ligação entre o C-10 e o C-19, com a eliminação consequente de ácido fórmico (fig. 5) (42).

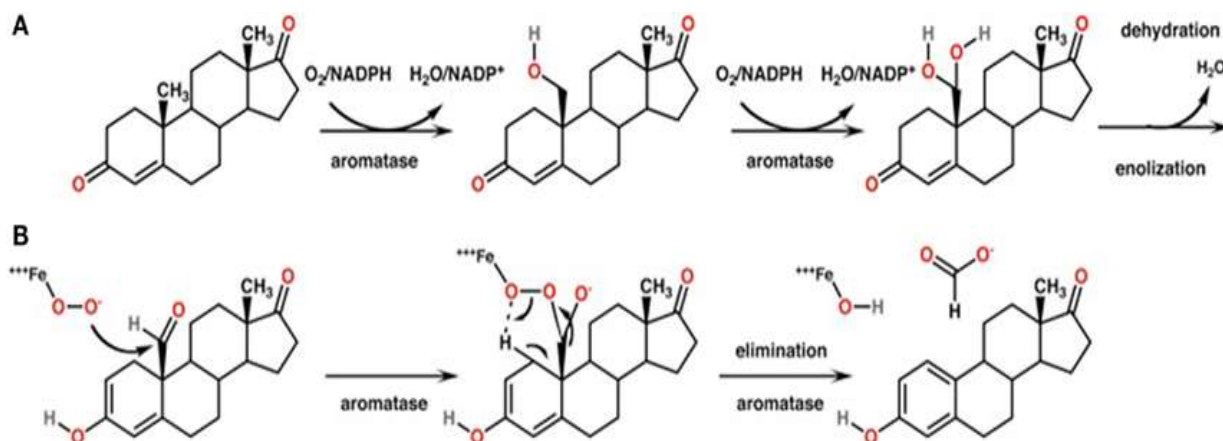


Figura 5 - Biossíntese de estrogénios pela aromatase (adaptado de Anat Biegon et al (80))

A expressão do gene da aromatase (*CYP19*) é mediada por promotores específicos de tecido, distribuindo-se numa área reguladora de 93 Kb. Para além desses promotores, ainda existe um número de fatores que podem mediar a atividade da aromatase como a cinase A, a cinase C, fatores de crescimento, citoquinas e esteróides (43). Os principais promotores são o PI.1 na placenta, o PII no ovário, o PI.4 na pele e tecido adiposo e tecido normal. Já no caso do tecido cancerígeno, são ativados diferentes promotores como o PI.3, II e I.7 levando a um aumento da expressão da aromatase no cancro da mama, com consequente expressão exagerada de estrogénios que promove o crescimento e progressão do tumor.

A inibição da aromatase tem mostrado ser bastante benéfica no tratamento do cancro da mama. Os inibidores da aromatase provaram ser a terapia endócrina mais efetiva até à data. No entanto, estes provocam alguns efeitos adversos, sendo os mais graves a perda de densidade óssea e alterações do metabolismo lipídico, devido à redução da atividade da aromatase de uma forma não seletiva em todos os locais do corpo. Assim sendo, inibir a aromatase através dos promotores associados ao tecido cancerígeno, parece ser uma estratégia útil para bloquear seletivamente a produção de aromatase localmente e consequentemente diminuir a síntese de estrogénios no cancro da mama (44).

A estrutura da enzima aromatase manteve-se desconhecida durante décadas. Foi só em 2009 que *Gosh et al*, obtiveram a estrutura tridimensional cristalina da aromatase purificada a partir da placenta humana, sendo complexada com a androstenediona. Ao contrário dos locais ativos de muitos P450 microsossomais que metabolizam fármacos, a aromatase possui uma fenda específica para androgénios, que liga a molécula da androstenediona de forma específica (37).

A obtenção da estrutura desta enzima permitiu então um maior conhecimento de qual poderá ser o melhor mecanismo para inibir a mesma o que levou à descoberta e desenvolvimento de inibidores da aromatase de outras gerações.

Após a síntese dos estrogénios pela aromatase, estes ligam-se ao RE para formar o complexo RE-estrogénios. Esta ligação ativa os genes alvo que promovem o crescimento dos carcinomas da mama estrogénio dependente. Durante a biossíntese de estrogénios, a aromatase forma um complexo de transferência de eletrões com o a redutase CYP450 (CPR). Nas últimas décadas, investigadores têm analisado as interações entre os membros da família CYP450 e a enzima CPR. A estrutura desta enzima consiste nos domínios: *NADP-binding domain*, *FAD-binding domain* and *FMN-binding domain*. Durante a síntese de estrogénios, os eletrões são transferidos do NADPH através dos domínios FAD e FMN do CPR para o grupo heme da aromatase. O modelo de docking molecular proposto por *Hong* e os seus colegas (45) (fig.6), revelou que o domínio FMN do CPR é submetido a um rearranjo que permite que a superfície proximal da aromatase encaixe na fenda entre o domínio FMN e FAD da redutase. Para além disso ainda identificaram vários resíduos, que incluem o K108 à superfície da aromatase, que está envolvido na interação com a redutase

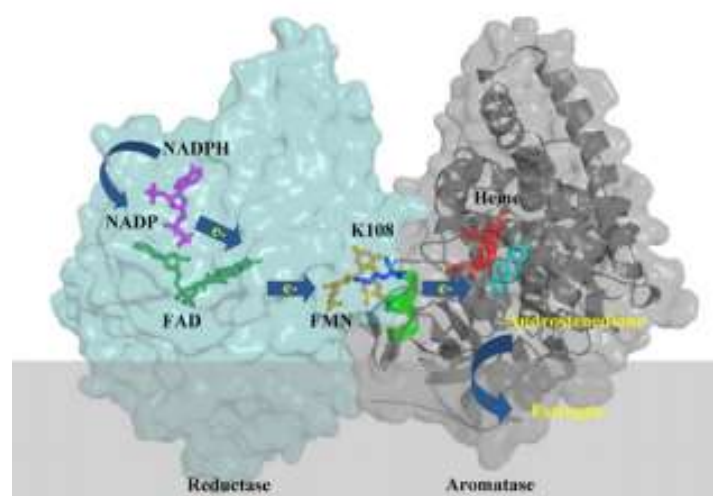


Figura 6 – Demonstração esquemática do modelo do complexo CPR-aromatase. NADP (roxo), FMN (laranja), heme (vermelho) e androstenediona (ciano). O resíduo K108 (azul) está localizado na hélix B' (verde) da aromatase e desempenha um papel importante na interação entre a CPR e aromatase e na transferência de eletrões. (retirado de (45))

Devido à semelhança estrutural dos inibidores esteróides (Exemestano), torna-se mais fácil prever a interação dos mesmos com a aromatase. De acordo com este estudo, um raio-x da estrutura da aromatase indica que os resíduos F221, W224 e M374 estão localizados no sítio ativo. Após docking do complexo aromatase-Letrozol

e Exemestano (figura 7) puderam confirmar a importância dos mesmos no local de ligação do substrato dos androgénios bem como dos IAs. No entanto, estes resíduos interagem de forma diferente consoante sejam inibidores esteróides ou não esteróides. Enquanto que os resíduos F221 e M374 aumentam a afinidade tanto da androstenediona e Exemestano como do Letrozol, o resíduo W224 mostrou um mecanismo diferente. A androstenediona e o Exemestano tiveram uma menor afinidade enquanto que o Letrozol tem uma maior afinidade (45).

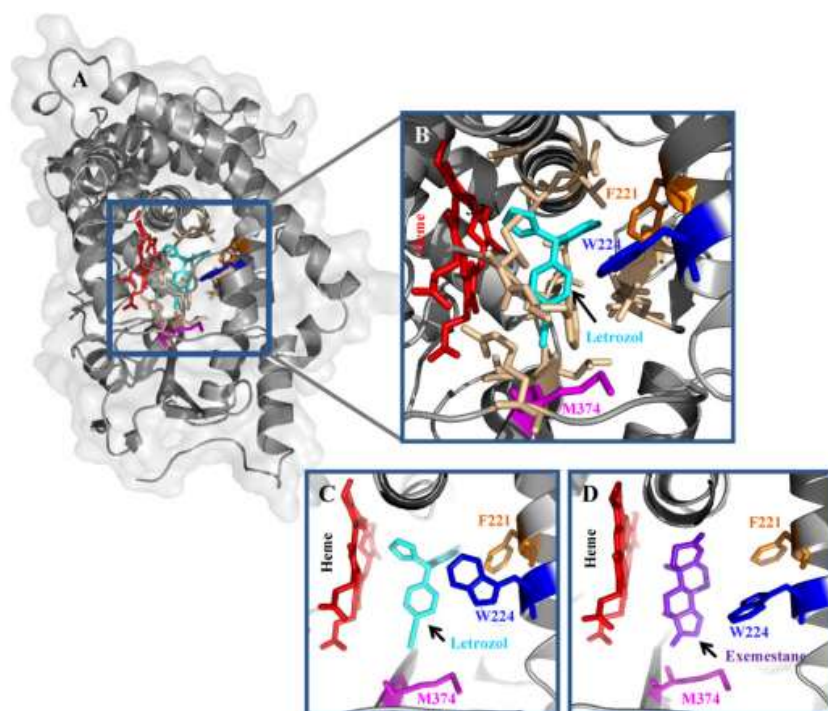


Figura 7 – Modelo de docking do complexo aromatase-letrozol. (A) Letrozol (ciano). (B) Quinze aminoácidos (castanho claro). Os resíduos F221, W224 e F374 estão a laranja, azul e mangenta respectivamente. (C) Aromatase-Letrozol. (D) Aromatase-Exemestano (roxo). (retirado de (45))

3.1. Inibidores da Aromatase

O tamoxifeno no geral é bem tolerado, no entanto em alguns casos mostrou que podia induzir efeitos secundários perigosos e até mortais devido à sua atividade agonista do estrogénio. Estes mesmos efeitos secundários levaram à procura de novos agentes hormonais com o objetivo de melhorar a eficácia do tratamento, sendo assim a terapia direcionada para a aromatase e a sua inibição, inibindo o último passo da conversão de androgénios a estrogénios (46)

Os IAs interferem com a capacidade do organismo de produzir estrogénios a partir de androgénios, por inibirem a atividade da enzima aromatase (47). Em mulheres pós-menopausa, os IAs têm o potencial de suprir os níveis de estrogénios em aproximadamente >96,7 – 98,9%. Foram desenvolvidas três gerações de acordo

com a ordem cronológica de desenvolvimento (48), associados a uma redução do espectro de ação, um aumento da especificidade e potência, bem como a redução de toxicidade (49). Por exemplo, enquanto que os inibidores de terceira geração, em média, provocam >98% de inibição, os de primeira geração provocam <90% de inibição da aromatização. Para além disso, ainda são divididos segundo o seu mecanismo de ação em tipo 1 e tipo 2 (tabela 2). Os inibidores do tipo 1 são análogos esteróides da androstenediona e ligam-se ao mesmo sítio da aromatase, mas ao contrário da androstenediona ligam-se de forma irreversível, através de uma ligação covalente entre o inibidor e as proteínas da enzima, chamados muitas vezes de inativadores da aromatase. Os inibidores do tipo 2 são não esteróides e ligam-se reversivelmente ao grupo heme da enzima e inibem competitivamente a ligação dos substratos androgénicos (46).

Tabela 2 - Classificação cronológica e segundo o mecanismo de ação dos inibidores da aromatase

	GERAÇÃO		
	Primeira	Segunda	Terceira
Tipo 1 (Esteróide)	Testolactona	Formestano	Exemestano
Tipo 2 (Não Esteróide)	Aminoglutetimida	Fadrozol, Vorozole	Anastrozol, Letrozol

A superioridade dos IAs de terceira geração sobre o tamoxifeno na terapia de cancro da mama avançado levou à decisão de substituir o tamoxifeno como primeira linha no tratamento adjuvante, considerado como “*gold standard*” para a maioria dos doentes. Estudos demonstram que os IAs possuem uma melhor tolerabilidade, bem como uma maior eficácia e melhor perfil de toxicidade.

Os efeitos adversos diferem dos do tamoxifeno. Apresentam menor toxicidade em termos de cancro endometrial, eventos tromboembólicos, afrontamentos e complicações ginecológicas. No entanto mulheres em terapia com IAs têm uma maior probabilidade de se queixarem de sintomas relacionados com a privação de estrogénios, bem como reportar efeitos adversos osteomusculares e doenças cardiovasculares.

O uso de IAs está associado com uma maior frequência de secura vaginal e perda de libido do que o tamoxifeno, no entanto há uma redução de sangramento vaginal e cancro endometrial. Os IAs estão associados também a afrontamentos e

suores noturnos, no entanto a proporção de mulheres a exibir essa instabilidade vasomotora é provavelmente menor que a observada em terapias com tamoxifeno (47). A nível de doenças cardiovasculares, tal pode ser explicado por alterações no metabolismo lipídico causado pela supressão de estrogénios (50)

No entanto o efeito adverso mais preocupante é a nível da perda de densidade óssea, aumentando o risco de fraturas. Estas diferenças devem-se ao facto do tamoxifeno exercer um efeito agonista parcial nos ossos, ao contrário dos níveis muito baixos de estrogénios causados pela administração de IAs (47). Assim sendo, deve ser ponderada a utilização de bifosfonatos (51) como terapia concomitante para prevenção de osteoporose.

Um outro tipo de efeito adverso são problemas osteomusculares: dores articulares e rigidez muscular. Existem evidências de que 20% dos pacientes não aderem à terapia prescrita de IAs, sendo que os problemas osteomusculares são responsáveis por 50% dessas desistências (50).

Apesar de os IAs serem uma terapia eficaz e cada vez mais utilizada, as resistências continuam a ser um grave problema. São vários os mecanismos descritos para a resistência: 1) desenvolvimento de hipersensibilidade dos RE a níveis muito baixos de estrogénios (47); 2) elevada expressão da enzima aromatase; 3) enzima aromatase com mutações genéticas; 4) estimulação do crescimento do tumor pela via não clássica e/ou estrogénios endógenos, uma vez que bloqueiam a síntese de estrogénios pela via clássica mas não afetam outras fontes de estrogénio (49) que podem interagir com os RE, como é o caso dos androgénios produzidos pelo córtex adrenal e os compostos exógenos estrogénicos, incluindo os estrogénios sintéticos, os poluentes industriais e os fitoestrogenios; 5) ativação ligando-independente das vias de sinalização dos estrogénios, por exemplo através das HER2, das MAPKs e do fator de crescimento tipo insulina 1 recetor que são capazes de ativar os RE independentemente da presença de estrogénios (52).

O IAs não são usados na mulher pré-menopausa com cancro da mama, uma vez que os ovários, estando ainda a funcionar, conseguem superar o facto dos estrogénios estarem bloqueados/inibidos através do aumento da hormona luteinizante (LH) e da hormona folículo-estimulante (FSH), resultando no aumento da produção de estrogénios, tornando os IAs ineficazes (53).

3.1.1. Inibidores não esteroides da aromatase

Tal como referido anteriormente, os IAs podem ser subdivididos em dois tipos, segundo o seu mecanismo de ação. Os inibidores não esteroides da aromatase tipo II são derivados barbitúricos (como a aminoglutetímida) ou pertencem à classe imidazol/triazol (54). Todos eles possuem um núcleo azol (fig.8), contendo um heteroátomo que possui um par de eletrões capaz de interagir de uma forma não covalente com o grupo heme da aromatase (Fe^{3+}), ocupando assim o local ativo da enzima onde se ligaria o substrato, de forma a inibir a ligação dos androgénios ao sítio catalítico. Este antagonismo é reversível e os IAs do tipo II podem ser retirados competitivamente do local ativo por substratos endógenos (55).

A aminoglutetímida foi o primeiro inibidor da aromatase, sendo inicialmente desenvolvido como anticonvulsivante para o tratamento da epilepsia, descobrindo-se mais tarde que inibia várias enzimas do citocromo P450, incluindo a aromatase. Apesar da aminoglutetímida ter sido usada com sucesso no tratamento do cancro da mama, apresentava algumas desvantagens: i) não era um fármaco muito potente e por isso era administrada em altas concentrações; ii) inibia enzimas envolvidas na produção de cortisol sendo por isso necessário a administração concomitante de corticosteroides (49).

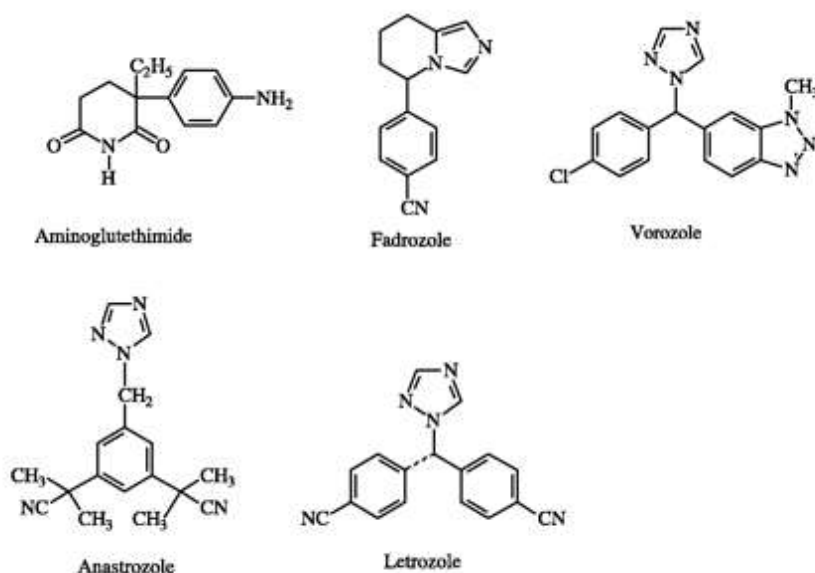


Figura 8 - Estruturas químicas dos inibidores não esteroides da aromatase – Fadrozol e Vorozol (2ª geração); Anastrozol e Letrozol (3ª geração) (adaptado de (54))

No entanto, este composto tornou-se o ponto de partida para a síntese de IAs de segunda e terceira geração não esteroides que possuísssem uma maior especificidade e eficácia e uma menor toxicidade (49). Os fármacos de segunda

geração incluem o fadrozol. Este tem uma maior potência e eficácia que a aminoglutetímida, no entanto haveria dúvidas sobre a sua especificidade. Para além disso o fadrozol causava diminuição da aldosterona, limitando o seu uso a doses que apenas produzissem à volta de 90% de inibição ou menos (48). Outros IAs de segunda geração foram investigados sem, no entanto, terem sido aprovados para uso clínico. A utilidade da primeira e segunda geração foi limitada não só pelos efeitos adversos como erupção cutânea, fadiga, tonturas, ataxia, náuseas e vômitos bem como a falta de especificidade. Os IAs não esteróides tinham uma tendência para ser menos específicos que os IAs esteróides, conseguindo assim inibir outras enzimas P450 como era o caso da aminoglutetímida.

Para ultrapassar estas barreiras, foram então desenvolvidos os IAs de terceira geração, contemplando o anastrozol e o letrozol, derivados de triazol, que mostraram ser mais potentes e com uma maior especificidade (fig.9 e tabela 3). Uma vez que eles não interagem significativamente com outras enzimas P450, também apresentam menos efeitos adversos nos doentes e uma menor toxicidade (41).

Tabela 3 - Potência de inibição da aromatase pelas 3 gerações de IAs (adaptado de Fabian CJ (47))

	1ª Geração	2ª Geração		3ª Geração		
Fármaco	Aminoglutetímida	Fadrozol	Vorozol	Letrozol	Anastrozol	Exemestano
Dose	1mg	2mg	1mg	2,5mg	1mg	25mg
% Inibição	91	82	93	99	97	98

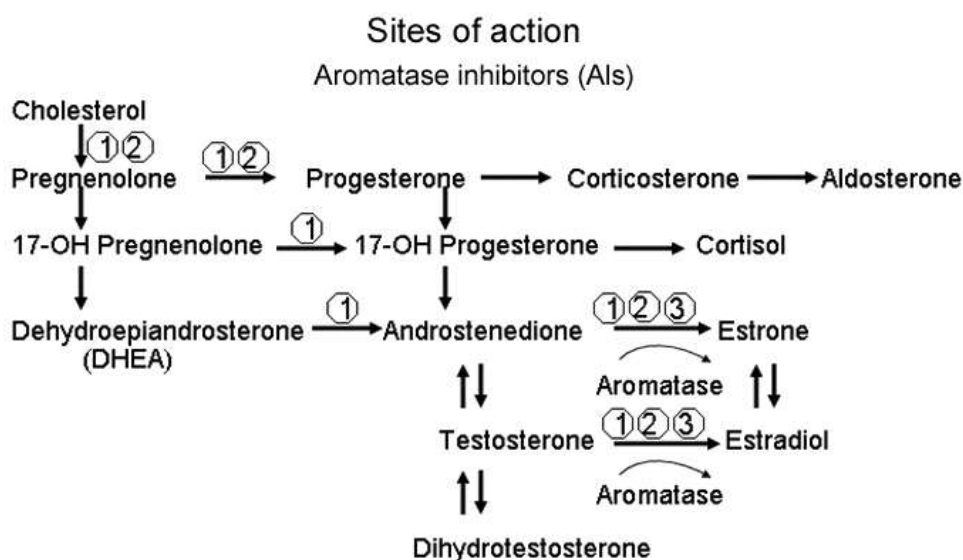


Figura 9 - Locais de ação dos diferentes IAs – (1) – IAs de Primeira Geração (aminoglutetímida); (2) – IAs de Segunda geração (fadrozol); (3) – IAs de Terceira Geração (anastrozol e letrozol) (retirado de Fabian CJ (47))

Tanto o anastrozol como o letrozol mostraram, no ensaio BIG e no ATAC respectivamente, ser superiores ao tamoxifeno, quer em termos de tolerabilidade e por isso um menor numero de efeitos adversos, quer em termos de eficácia, prolongando o tempo de sobrevivência sem doença, com uma melhoria no tempo de recorrência e uma redução na incidência de cancro da mama contra-lateral (46). No entanto, segundo a tabela 3, o letrozol seria o IA ideal, com uma potência de inibição superior a todos os outros compostos. Em mulheres pós-menopausa, o letrozol alcança uma melhor supressão dos níveis de estrogénio e uma maior inibição *in vivo* da aromatização do que o anastrozol (56). Neste estudo realizado, os níveis de aromatase foram detetados em 11 de 12 pacientes durante o tratamento com anastrozol (media de 97,3%) mas em nenhum dos 12 pacientes durante o tratamento com letrozol (>99,1%). Num outro estudo (57), conduzido em 54 mulheres em pós-menopausa com cancro da mama invasivo, uma dose de 2.5mg de letrozol obteve uma inibição mais completa da aromatase do que uma dose de 1mg de anastrozol, resultando numa diminuição maior de estradiol.

Vários foram os ensaios clínicos a comparar os IAs com o tamoxifeno, mas será que haveria diferenças significativas entre os IAs de terceira geração? No ensaio “*The Letrozole Femara Versus Anastrozole Clinical Evaluation (FACE)*” foi comparada a eficácia e a segurança da terapia adjuvante com letrozol vs anastrozol em pacientes posmenopausa com RE+. Foram divididos em dois grupos de forma aleatória para receber letrozol (2,5mg) ou anastrozol (1mg) uma vez por dia durante 5 anos até recorrência da doença. Foram estudados dois “*end points*”, sendo o primário “*disease-free-survival*” (DFS) e o secundário “*overall survival and safety*” (OS). Num total de 4136 doentes, apenas 709 foram analisados. O rácio de DFS para o letrozol foi de 84,9% versus 82,9% do anastrozol, enquanto que o OS a 5 anos estimado foi de 89,9% para o letrozol e 89,2% para o anastrozol. Os autores puderam assim concluir que o letrozol não demonstrou uma superioridade significativa na eficácia ou segurança comparando com o anastrozol (58).

3.1.2. Inibidores esteróides da aromatase

Inicialmente, os inibidores da aromatase foram desenvolvidos tendo por base a competição direta com o substrato natural no sitio ativo da enzima, resultando no desenvolvimento de agentes como a testolactona que são análogos do substrato natural da aromatase, a adrostenediona. Estes compostos são reconhecidos pelo sitio ativo da enzima aromatase como um substrato alternativo, sendo posteriormente

convertidos pela aromatase num intermédio reativo que se liga de forma irreversível e covalente ao sítio ativo, inativando permanentemente a enzima. É por isso que estes IAs são também conhecidos como inativadores ou inibidores suicidas (fig.10). Uma vez que a inibição é irreversível, a produção de novo estrogénio está dependente da biossíntese de novas moléculas aromatase. Isto resulta num número reduzido de efeitos adversos, uma vez que o efeito do inibidor persiste mesmo após sair do organismo não sendo assim necessária a presença contínua do composto para manter a inibição (49)(59).

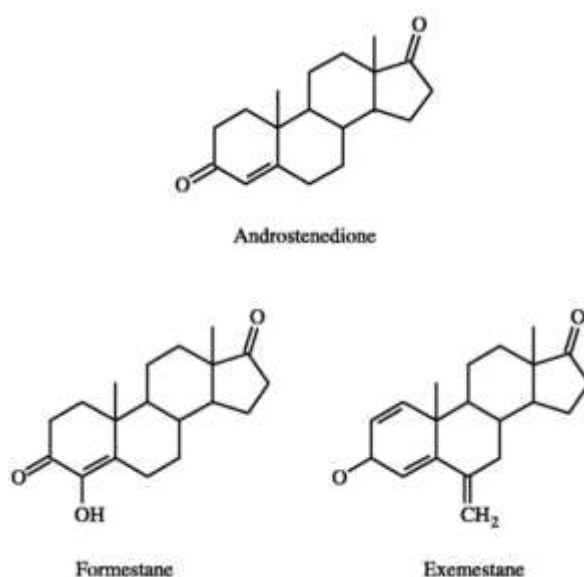


Figura 10 - Estruturas químicas do substrato da aromatase e dos inibidores da aromatase esteróides (adaptado de Jürgen Geisler and Per Eystein Lønning (54))

Apesar da testolactona ter sido usada na terapia ao longo de 20 anos, o seu benefício bem como a sua eficácia e tolerabilidade moderadas, tornaram muito atrativa a oportunidade de pesquisa e desenvolvimento de novos compostos, mais potentes, mais específicos e mais seguros no início dos anos 80.

O fármaco de segunda geração inclui o formestano (4-hidroxiandrostenediona), que foi introduzido no mercado em 1993 com o nome Lentaron (59) e utilizado principalmente em casos que apresentassem resistência ao tamoxifeno. Na altura era um IA potente e era o mais seletivo e com maior eficácia, no entanto tinha a desvantagem de ter de ser administrado por injeções intramusculares (60) devido ao intenso metabolismo hepático.

Sendo assim, para tentar ultrapassar o metabolismo não favorável bem como a fraca biodisponibilidade oral do formestano, foi necessário o desenvolvimento de novos compostos que pudessem apresentar melhorias neste campo. Foi assim que

surgiu o composto esteroide de terceira geração, o exemestano. Entrou em desenvolvimento em 1986, sendo introduzido no mercado em 1999 pelo nome de Aromasin (59), que ao contrário do formestano podia ser administrado oralmente (em doses de 25mg diárias) e era um inativador enzimático bem mais potente.

A estrutura androgénica dos IA esteróides pode levar a efeitos hormonais diferentes para além da redução da produção de estrogénios causado pela inibição da aromatase. O seu metabolito principal é o 17-hidroexemestano que se liga com uma elevada afinidade ao recetor dos androgénios. Vários estudos demonstraram e confirmaram uma redução da densidade óssea pelos inibidores não esteróides, bem como um aumento na incidência de fraturas. Embora o exemestano tenha efeitos inibitórios semelhantes na aromatização de androgénios a estrogénios, parece ter demonstrado um efeito androgénico dos seus metabolitos, pequeno, mas importante que pode levar a uma diminuição da reabsorção óssea, apresentando assim menos efeitos adversos neste campo, o que poderia ser visto como uma vantagem em relação aos outros compostos. Este efeito parece ocorrer devido à estrutura esteróide do exemestano, que poderá exercer um efeito androgénico nos ossos que é visível através do aumento de marcadores de formação de ossos que não é visível nos não esteroides. No entanto serão precisos estudos maiores e mais longos para realmente perceber a extensão dos efeitos do exemestano comparados diretamente com os IAs não esteroides (55).

4. Esteróide Sulfatase – Importância no cancro da mama

A inibição da aromatase começou a ser estabelecida como a melhor opção de tratamento em câncros da mama hormono-dependentes na mulher pós-menopausa. No entanto, apesar dos efeitos benéficos dos IAs, a resistência a estes pode causar recaídas da doença bem como progressão das metastases. Deste modo, depois do sucesso desta enzima, várias foram as enzimas alternativas a esta envolvidas na síntese e metabolismo esteróide que foram estudadas como possíveis alvos. Uma das mais promissoras foi a esteróide sulfatase (STS) que é responsável pela hidrólise de sulfatos esteróides, como o sulfato de estrona (E1S) e o sulfato de desidroepiandrosterona (DHEAS) a estrona (E1) e a desidroepiandrosterona (DHEA), respetivamente (61), sendo depois reduzidos a estradiol e androstenediol pelo 17 β -HSD1, que é sobreexpresso na maioria dos câncros da mama. A via da STS é considerada como a maior fonte que leva à formação de estrogénio, o que poderá explicar o valor baixo de resposta a inibidores potentes da aromatase em câncros da mama RE+ (17). O androstenediol, apesar de ser um androgénio, consegue ligar-se ao RE e estimular o crescimento das células do cancro da mama. Apesar da sua afinidade ser mais baixa que a do estradiol, tem sido sugerido que poderá ser igualmente potente por ter concentrações bem superiores no plasma e tecidos (62). Depois da síntese de estrona a partir da androstenediona pela aromatase, um grande número de moléculas é rapidamente sulfatado a sulfato de estrona (E1S) por sulfotransferases que estão distribuídas pelo organismo. As concentrações no plasma de E1S são 10 a 20 vezes superiores aos valores de estrona e de estradiol. Para além disso o tempo de semi-vida no plasma do E1S (10-12horas) é consideravelmente superior aos 20-30min da estrona e estradiol. Sendo assim, pensa-se que o E1S atua como um reservatório para a formação de estrogénios ativos pela via da sulfatase esteróide (61). A expressão da STS é detetada em 90% dos tumores da mama, enquanto que a expressão da aromatase apenas é encontrada em 60 a 70%, o que mais uma vez evidencia a importância do desenvolvimento de terapias tendo como alvo a inibição das STS (17).

A esteróide sulfatase pode ser encontrada nas membranas do retículo endoplasmático. O seu gene está localizado no cromossoma X (Xp22.31), com 146kb. A STS é maioritariamente expressa na placenta, com níveis mais baixos na mama, pele, fígado, pulmões, ovários, glândula adrenal, endométrio, cérebro e alguns tecidos (63)

A STS cataliza a hidrólise do sulfato num mecanismo de ação com quatro passos. (I) ativação da FGly75 (*formilglycine*) através de uma molécula de água; (II) ataque nucleofílico do hidroxi-FGly no átomo S do substrato (ou seja E1-S ou DHEA-S) que é facilitado pelo Ca^{2+} ; (III) saída do E1 ou DHEA; (IV) saída do HSO_4^- e regeneração do FGLy (fig.11).

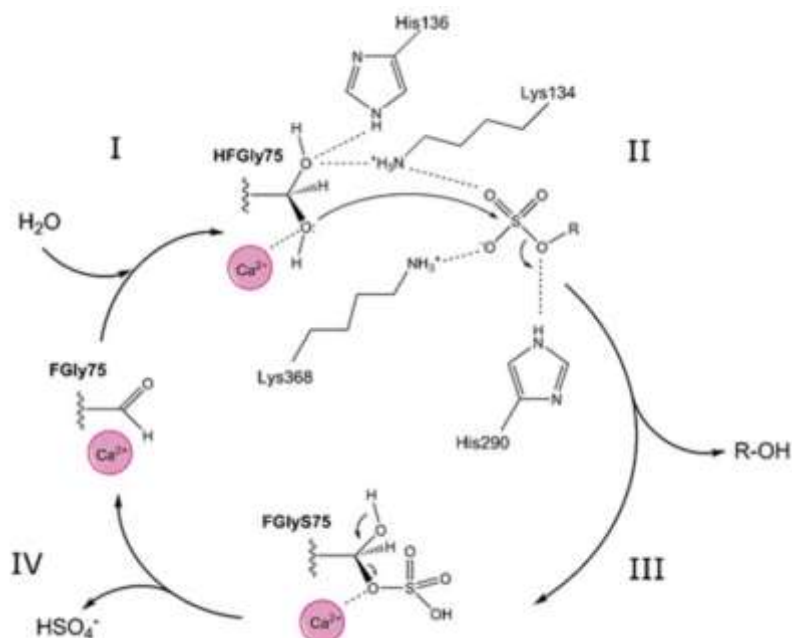


Figura 11 - Mecanismo de ação da enzima sulfatase esteróide
(retirado de Tea Lanišnik Rižner em (63))

Enquanto que 60-80% de todos os cancros da mama pós-menopausa são classificados como RE+, o recetor dos androgénios (RA) é expresso em 80% dos pacientes. Para além disso, o RA é encontrado em vários doentes com RE negativo. Isto comprova que as células humanas do cancro da mama podem ser estimuladas por androgénios via os RA na ausência dos RE. A via da esteróide sulfatase é responsável pela produção de outro esteróide com propriedades estrogénicas, nomeadamente o 5-androstenediol, a partir do DHEAS. O 5-androstenediol, embora seja um androgénio, consegue ligar-se aos RE e tem vindo a mostrar que estimula a proliferação de varias células do cancro da mama RE+. Apesar da sua baixa afinidade para os RE, o fato da sua concentração ser muito superior à do estradiol, levou à especulação de que poderá ter propriedades estrogénicas muito semelhantes às do estradiol. Isto pode ser provado pelos casos em que se utilizam IAs, em que a síntese de estradiol é reduzida a mais de 99% para níveis indetetáveis, mas ao mesmo tempo os tumores tornam-se sensíveis a concentrações muito baixas de estrogénios. Inclusive, o 5-androstenediol já demonstrou conseguir estimular o crescimento do

tumor mesmo na presença de inibidores da aromatase (61). Num estudo realizado por *Billich et al* (64), a inibição da esteróide sulfatase bloqueou a estimulação do crescimento das células tumorais MCF-7 pelo DHEAS; o mesmo efeito não foi obtido quando se utilizava um IA, o que indicava que a produção de 5-androstenediol pela DHEAS ocorre de uma forma totalmente independente da via da aromatase. A expressão do mRNA da STS está significativamente mais elevada nos tecidos malignos do cancro da mama, comparado com o tecido normal.

Deste modo, e motivado por algumas destas descobertas, foram desenvolvidos vários inibidores da esteróide sulfatase. Estes compostos mostraram ser potentes inibidores da esteróide sulfatase *in vivo* e estão atualmente a ser testados em ensaios clínicos para o tratamento do cancro da mama.

4.1. Inibidores da Esteróide Sulfatase

Com o aparecimento de cada vez mais evidências em estudos anteriores sobre a esteróide sulfatase, a procura por inibidores da mesma começou no fim dos anos 80 e início dos anos 90, e até à data levou dois compostos a entrar em ensaios clínicos. Tal como os IAs, os inibidores da STS também só podem ser usados em mulheres em pós-menopausa. Estudos destes compostos em pré-menopausa têm de ser acompanhados pela remoção dos ovários.

No início dos anos 90 começaram a explorar variações no grupo fosfato da E1S substituindo-o por outras moléculas. No entanto as primeiras mudanças realizadas levaram à descoberta de compostos com uma fraca inibição, que eram ineficazes *in vivo* e com pouco interesse a nível terapêutico. Foi apenas quando tentaram trocar o grupo OH do sulfato por um NH₂ produzindo um grupo sulfamato (-OSO₂NH₂) que resultou na inativação irreversível e muito potente das STS (65).

Em geral, os inibidores da STS podem ser divididos em compostos esteróides ou irreversíveis e não esteróides ou reversíveis. Os reversíveis ligam-se de forma não covalente, prevenindo a ligação do substrato. A inibição irreversível é manifestada pela incapacidade de restaurar a atividade da enzima (65). Dentro dos compostos esteróides os sulfamatos têm sido os mais estudados *in vitro* e *in vivo*. Estes incluem o E1-3-O-sulfamato (EMATE) e o E2-3-O-sulfamato (E2MATE), onde o EMATE foi identificado como o primeiro inibidor irreversível das STS, apesar de ter sido inicialmente desenhado como um prófarmaco para a terapia de substituição de estrogénios. Os inibidores não esteróides também foram desenvolvidos, sendo que o 667 Coumate (ou STX64 ou irosustat) apresentou maior potência que o EMATE. Para

além disso, nos últimos anos foram desenvolvidos vários derivados do EMATE e do STX64 como inibidores da STS de segunda e terceira geração. Estes incluem o composto KW-2581, o STX213 e o STX1938, que têm mostrado ser mais potentes que o STX64 (figura 12) (63).

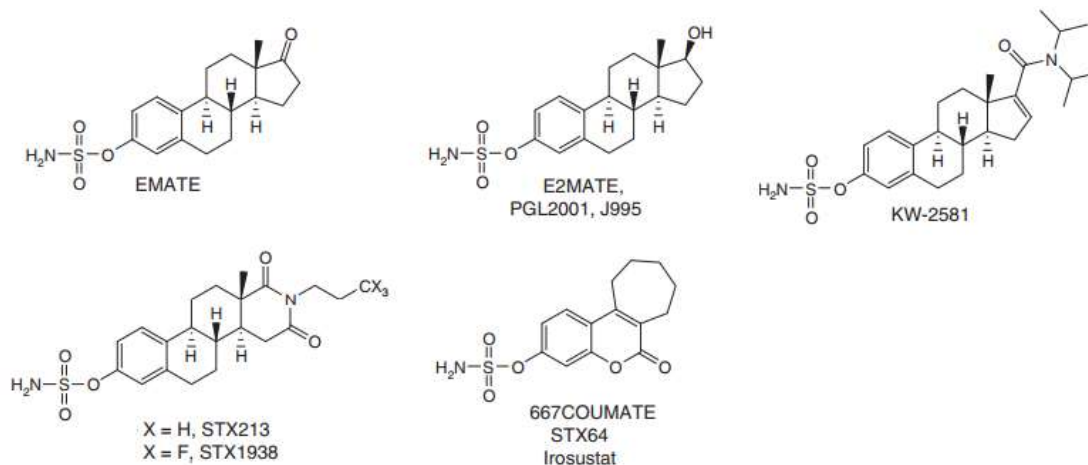


Figura 12 - Estruturas químicas de alguns dos inibidores da STS desenvolvidos
(adaptado de Spencer J Williams (65))

4.1.1. STX64/ 667 Coumate/ Irosustat

Um dos primeiros inibidores da STS foi o EMATE (fig.12), com um mecanismo irreversível. No entanto descobriu-se que este tinha propriedades estrogênicas potentes. Esta particularidade estimulou o desenvolvimento e descoberta do Irosustat (61).

O Irosustat (fig.12) foi o primeiro inibidor da STS a entrar em ensaios clínicos de fase I, nomeadamente dois, em mulheres em pós-menopausa com cancro da mama RE+. O primeiro ensaio clínico recrutou 14 pacientes com cancro da mama pós-menopausa que já tinham recebido pelo menos uma outra terapia endócrina. Este foi bem tolerado com reduzidos efeitos adversos. Quatro pacientes que tinham mostrado progressão com IAs previamente, mostraram evidências de doença estabilizada durante sete meses (62), para além de ter havido uma redução significativa de estrona, estradiol, androstenediol e DHEA (66). O segundo ensaio clínico envolveu doses diferentes, concluindo que 40mg era a dose ótima, em que se observou quase total inibição das STS após 7 e 28 dias de administração oral diária, bem como inexistência de toxicidade de nível 3 nos primeiros 28 dias. A doença apresentou-se estabilizada durante 6 meses ou mais. Tendo em conta estes primeiros testes, o Irosustat entrou em ensaios clínicos de fase II (65). Infelizmente os resultados dos ensaios clínicos de fase II realizados pelo grupo Ipsen LTd, não repetiram o sucesso.

Os resultados de outros ensaios de fase I/II no cancro da mama metástico são necessários (67). O estudo IRIS foi então desenhado para investigar a eficácia e tolerabilidade em mulheres pós-menopausa que tivessem progredido com IAs como primeira linha, tendo obtido benefícios clínicos. Este estudo pretendia então, testar a hipótese de que o bloqueio das STS com o Irosustat depois do uso continuado de IA poderia resultar em mais benefícios clínicos. Este composto foi então dado numa dose de 40mg diárias em conjunto com a primeira linha de IA. A terapia continuou até progressão da doença, morte, desenvolvimento de toxicidade elevada ou desistência. O Irosustat foi bem tolerado com a maioria dos efeitos adversos serem de nível 1 ou 2, sendo os mais comuns: pele seca, náuseas e fadiga. Vários pacientes tiveram a doença estabilizada por pelo menos 6 meses. Os valores de androstenediona, DHEA foram mais baixos. Os resultados deste ensaio demonstraram evidências de que pela primeira vez a terapia combinada de IA e inibidores da STS poderá ser benéfico, seguro e bem tolerado. No entanto serão necessários mais ensaios (66).

4.1.2. STX 213 e STX1938

Muitos foram os esforços de manter o esqueleto esteróide mas ultrapassar as propriedades estrogénicas do EMATE. Estas estratégias incluíram a modificação da estrutura dos anéis ou a introdução de substituintes em várias posições para gerar derivados não estrogénicos que continuassem a ser potentes inibidores da STS. Foi assim criado o STX213, onde o anel D ciclopentano foi substituído por um anel piperidina-2-6-diona (61). Este demonstrou ser 8x e 18x mais potente *in vitro* do que o STX64 e o EMATE respetivamente e sem qualquer atividade estrogénica. Por isso foi escolhido para desenvolvimento pré-clínico como um inibidor da STS de segunda geração. A maior diferença dos inibidores de segunda geração é a sua prolongada inibição das STS. O tempo para recuperar 50% da atividade da STS no fígado do rato foi à volta de 3 dias para a STX64 e de 10 dias para o STX213 quando testados numa única dose oral de 10mg/kg de cada inibidor (68).

Um outro composto bastante semelhante ao STX 213, de terceira geração foi o STX 1938, com diferenças mínimas na estrutura. Apesar do STX 1938, num estudo realizado em conjunto com o STX 213 e o STX 64, ter mostrado eficácia na redução do crescimento do tumor bem como uma maior duração da inibição (17 dias), este causou alguma perda de peso e por isso decidiram que este composto não iria continuar com mais estudos (69).

Para explorar o papel do grupo trifluorometil (CF_3) no aumento da potência comparando com outros, Lawrence Woo (70) e os seus colegas, realizaram o *docking* do inibidor STX1938 no sítio ativo da esteroide sulfatase humana (fig. 13). O grupo sulfamato está direcionado à fenda catalítica da esteroide sulfatase onde o íon Ca^{2+} e o formilglicine estão localizados. Interações entre o grupo sulfamato e os resíduos dos aminoácidos (Lys134, Lys368, His136, His290, e Thr165) são bastante comuns. A estrutura esteróide do STX1938 está relativamente próxima a vários aminoácidos lipofílicos (Val486, Val177, Phe488, Phe178, Leu74, Leu167, Leu103, e Val101) que estão implicados no reconhecimento do substrato. Posto isto, concluíram que o grupo trifluorometil pode realizar interações hidrofóbicas com os resíduos de aminoácidos. Para além disso, também identificaram um aminoácido no sítio ativo da esteroide sulfatase, o Arg⁹⁸, que pode ser responsável por ligações de hidrogénio com o trifluorometil. Foi sugerido que interações $\text{C-F} \cdots \text{H-O}$ e $\text{C-F} \cdots \text{H-N}$ poderão proporcionar efeitos estabilizantes benéficos entre o ligando e o seu alvo. Os resultados do *docking* sugerem então que as interações provenientes do grupo trifluorometil, podem ser as responsáveis por um aumento na potência observado neste composto (70).

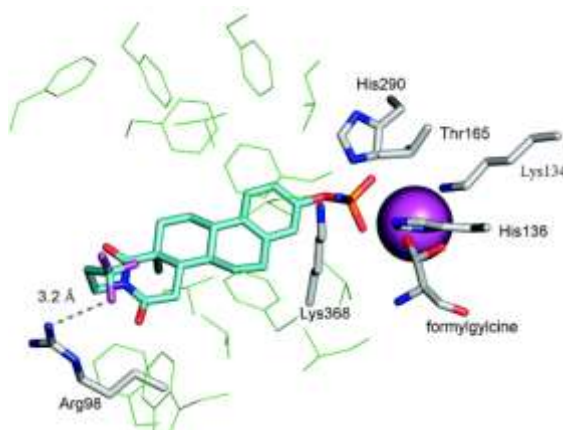


Figura 13 – *Docking* do STX1938 (verde azulado) na estrutura da esteroide sulfatase humana. Ca^{2+} (roxo), formilglicine e aminoácidos de interesse (retirado de (70))

4.1.3. KW-2581

O KW-2581 foi outro dos inibidores da STS de segunda fase que mostrou ter características potentes de inibição das STS e que mostrou poder vir a ter muito potencial em ensaios pré-clínicos. A partir de células dos ovários de hamsters chineses que expressavam arilsulfatases humanas, este composto mostrou ter uma elevada potencia para a inibição das STS. Para além disso também mostrou uma

elevada seletividade, uma vez que precisava de concentrações 1000x superiores para inibir outras enzimas. Ainda mais, não exibiu qualquer atividade estrogénica *in vitro* em células humanas MCF-7 de cancro da mama, nem *in vivo* em modelos com ratos sem ovários. Num outro estudo (71) este composto apresentou uma inibição da atividade das STS em >95% após 24 horas, e causou diminuição do tamanho do tumor depois de um regime de 4 semanas. Todos estes resultados demonstram o potencial terapêutico deste composto e fazem dele um candidato a ensaios clínicos de fase 1 (72)(67).

5. Limitações e perspectivas futuras

Existem duas vias principais de formação dos estrogénios nas mulheres pós-menopausa, a da aromatase e a da sulfatase. Tal como já foi explicado anteriormente, apesar da inibição da aromatase ter demonstrado grandes benefícios, ainda possui algumas lacunas. Uma delas é que não consegue suprimir a produção de Adiol. Este esteróide possui propriedades estrogénicas potentes e por isso torna necessário o desenvolvimento de novas estratégias que maximizem ao máximo a inibição dos estrogénios.

Uma área em grande evolução é o desenvolvimento de compostos com mais do que um alvo que incluem a inibição das STS. Esta estratégia tornou-se muito promissora uma vez que o farmacóforo sulfamato mostrou ser viável quando junto a várias espécies fenólicas, e uma escolha ponderada e certa destas espécies, poderá resultar num benefício terapêutico (65).

Normalmente quando é necessária uma terapia com vários alvos, existem três abordagens possíveis. A combinação de fármacos pode ser administrada como um cocktail de dois ou mais fármacos separadamente; pode ser reformulada num comprimido com os vários componentes; ou então criado um composto que seja capaz de atacar ambos os alvos ao mesmo tempo (67). Têm sido demonstradas as vantagens terapêuticas de usar um único composto comparando com uma abordagem múltipla, evitando assim interações entre os fármacos que levam a uma maior eficácia e menor toxicidade. Para além disso, uma vez que existem tumores que desenvolvem resistência a compostos com um único alvo, ao direcionar para uma segunda enzima poderá ultrapassar-se ou evitar as possíveis resistências.

5.1. Inibidores duplos da aromatase e esteróide sulfatase

Com a confirmação do potencial de ambas as terapias e de modo a maximizar a redução dos estrogénios, foi sugerida uma terapia combinada com inibidores duplos da aromatase e da esteróide sulfatase.

Embora seja possível a administração de inibidores da aromatase e da esteróide sulfatase separadamente, uma alternativa clinicamente mais favorável seria o desenvolvimento de uma molécula única com propriedades de um inibidor duplo da aromatase e sulfatase (DASI – *dual aromatase-sulfatase inhibitors*), evitando interações entre medicamentos, levando a uma maior eficácia clínica e menor toxicidade (17)(72). Uma forma possível de aplicar este conceito seria a combinação

de farmacóforos inibidores de ambas as enzimas, numa única identidade molecular. Para tal, a estratégia passa por inserir o farmacóforo para a inibição da STS numa molécula de IA, enquanto este mantém a sua capacidade de inibir a aromatase (73).

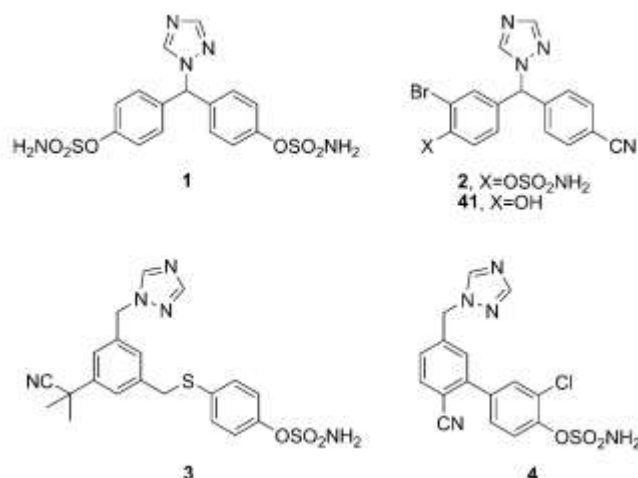


Figura 14 - Estruturas químicas de DASI (adaptado de Paul M. Wood et al (73))

Alguns destes DASI que estão a ser desenvolvidos e estudados são os compostos 1 e 2 (figura 14) baseados na estrutura do letrozole e o composto 3 baseado no anastrozole. Para além desta abordagem, também têm sido reportados DASI obtidos através da introdução do farmacóforo para a inibição da aromatase numa molécula desenhado para a inibição das STS, como é exemplo o composto 4 (73). Todos eles têm demonstrado uma atividade significativa *in vitro* contra ambas as enzimas em células JEG-3, mas ainda não foram testados em estudos pré-clínicos.

Um outro composto desenvolvido foi o STX681 (fig.15), com um substituinte sulfamato na posição para do anel que foi capaz de inibir a atividade da aromatase e da STS em 82 e 98% respetivamente quando administrado numa dose de 10mg/kg a ratos fêmea. Num estudo pré-clínico para testar a eficácia deste composto, foram incorporadas células MCF-7 que sobre expressavam aromatase e STS em ratos (74). Os resultados demonstraram que o STX681 conseguia inibir o crescimento tumoral potenciado pelas enzimas. Para além disso a combinação de letrozol com o Irosustat não demonstrou ser mais eficaz do que o STX681 sozinho na inibição dos níveis de E2 e no crescimento do tumor.

Considerando a estrutura-atividade (SAR) para os derivados destes compostos, observou-se que uma extensão da distância entre os farmacóforos é benéfico para a atividade anti-aromatase mas diminuiu os efeitos anti-STs. A adição de um grupo halogénio na posição orto ao grupo sulfamato resulta num aumento da inibição de ambas as enzimas. Para além disso ainda sugerem que uma maior inibição

é conseguida alterando o substituinte para-ciano para o para-cloro, sugerindo que este consegue interagir com o sitio ativo da enzima (73).



Figura 15 - Estrutura química do STX681 – DASI
(adaptado de Paul M. Wood et al (73))

5.2. Inibidores duplos da STS e moduladores seletivos dos recetores de estrogénio

O tamoxifeno é um pró-fármaco que é metabolizado a 4-hidroxitamoxifeno que exerce efeitos anti estrogénicos nos tecidos da mama, no entanto atua como agonista dos estrogénios noutros tecidos. Tendo em conta o potencial da inibição das STS para inibir a síntese de estrogénios bem como o potencial dos anti estrogénios para inibir a ação dos RE α , houve um aumento do interesse pelo desenvolvimento de anti estrogénios com substituintes sulfamatos.

Um dos compostos mais promissores desenvolvidos foi o SR16157 (fig. 16) que é um inibidor potente das STS que depois de se ligar à enzima STS, sofre uma reação enzimática pela enzima STS e liberta o composto fenólico SR16137, um anti estrogénio seletivo potente com efeitos benéficos nos ossos e a nível cardiovascular. Sendo assim o SR16157 tem o potencial de inibir tanto a biossíntese de estrogénios como a ação dos RE α (65). Num estudo realizado (75), o SR 16157 mostrou ser altamente efetivo como inibidor do crescimento tumoral, sendo dez vezes mais potente que o antiestrogénio SR16137 e o tamoxifeno na inibição do crescimento de células de cancro da mama MCF-7. Para além disso, o SR16137 melhorou quando comparado com o tamoxifeno, aumentando a afinidade para os RE α e a atividade anti estrogénica. Sendo assim estes resultados mostram que o SR16157 é um composto promissor na terapia do cancro da mama, no entanto serão necessários mais estudos pré-clínicos.

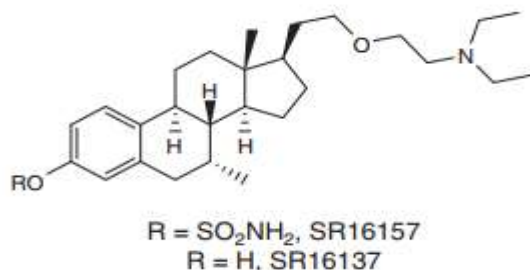


Figura 16 - Estrutura química dos compostos SR16157 e SR1637 (adaptado de Spencer J Williams (65))

5.3. Inibidores duplos da 17 β -HSD1 e STS

A 17 β -hidroxiesteróide desidrogenase (17 β -HSD1) é uma enzima envolvida na biossíntese dos estrogénios/androgénios que converte o estrogénio a estradiol e a DHEA a adiol. Um grupo de investigadores *Mohamed Salah et al* (76) decidiram investigar a possibilidade de inibidores duplos da STS e da 17 β -HSD1 como potencial terapia em doenças dependentes de estrogénio. A estratégia mais uma vez, passou por combinar a estrutura necessária para um bloqueio forte da 17 β -HSD1 com um grupo sulfamato que é o responsável pela inibição da STS (fig.17). No entanto a atividade contra a STS necessitou de um substituinte adicional no anel aromático do grupo sulfamato. No caso do substituinte ser um Cl na posição 3, este mostrou aumentar a atividade contra a 17 β -HSD1 e a seletividade pela 17 β -HSD2. Em ensaios celulares mostrou ter uma atividade semelhante em ambas as enzimas. Num valor de 400nM inibiu de uma forma eficiente a proliferação de células T47D estimuladas pela E1S e pela E1, não demonstrando citotoxicidade. Sendo assim este composto pode servir como base para o desenvolvimento de novas terapias em doenças estrógeno-dependentes.

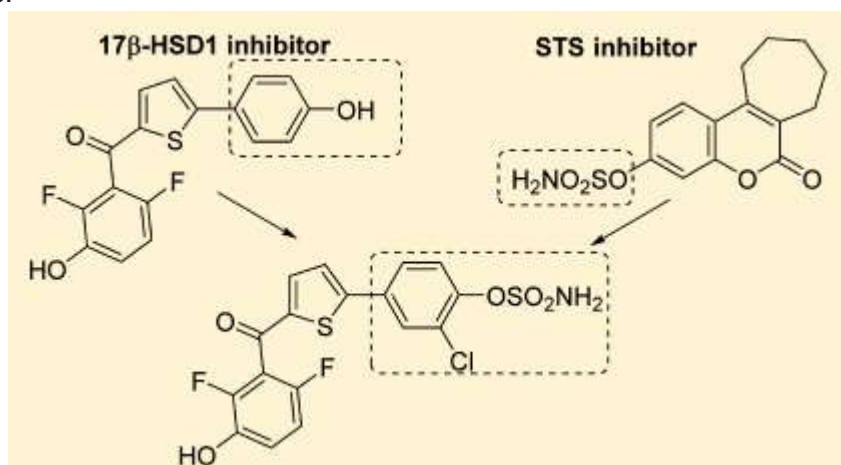


Figura 17 - Estrutura química do inibidor duplo de 17 β -HSD1 e STS (adaptado de Mohamed Salah et al (76))

6. Conclusões e Discussão

O cancro da mama é a forma mais frequente de cancro nas mulheres em todo o mundo, sendo responsável por o maior número de mortes. Segundo as estatísticas tem tendência para aumentar a sua incidência ainda mais nos próximos anos. Para além disso, uma vez que os medicamentos disponíveis no mercado perdem eficácia com o decorrer do tempo, principalmente devido a resistências, e porque são responsáveis pelo aparecimento de efeitos adversos, surge a necessidade do desenvolvimento de novos fármacos, mais potentes, mais eficazes e menos tóxicos.

Os estrogénios apresentam um papel importante na carcinogénese do cancro da mama, através do desenvolvimento e do crescimento das células tumorais em cancros da mama hormono-dependentes. Sendo assim, ter como alvo a inibição destas hormonas, parece ser uma boa opção terapêutica. Neste trabalho foi então feita uma revisão das terapêuticas hormonais existentes, com maior foco nos inibidores da aromatase e da esteróide sulfatase.

Durante vários anos, o tamoxifeno (um SERM) foi considerado como a terapêutica *gold standard* no tratamento do cancro da mama hormono-dependente. No entanto, o aparecimento de resistências e de efeitos adversos levou ao desenvolvimento de inibidores da aromatase. A aromatase é uma enzima responsável pelo último passo da biossíntese dos estrogénios, logo a sua inibição irá provocar uma diminuição da síntese de estrogénios. Estes inibidores demonstraram ser bastante superiores a nível de eficácia e menos tóxicos, passando a ser a terapêutica de primeira linha em mulheres pós-menopausa. Os IAs são subdivididos em três gerações, tendo em conta a ordem cronológica de desenvolvimento bem como o seu mecanismo de ação, em esteróides e não esteróides. Os esteróides são análogos esteróides da androstenediona e ligam-se ao mesmo sítio da aromatase de forma irreversível enquanto que os não esteróides ligam-se reversivelmente ao grupo heme da enzima e inibem competitivamente a ligação dos substratos androgénicos. Hoje em dia, os fármacos mais utilizados são os de 3ª geração, Anastrozol, Letrozol e Exemestano todos eles com percentagens de inibição da aromatase superior a 97%, sendo que o Exemestano apresenta mais de 99%. No entanto, também estes não estão isentos de resistências e de toxicidade, principalmente a nível osteomuscular, como a redução da densidade mineral óssea e um aumento do risco de fraturas. A pesquisa de novas moléculas como potenciais IAs pode ser uma mais valia no futuro, levando à descoberta de novos compostos mais potentes e mais específicos.

Mais recentemente foi descoberta uma outra enzima implicada no metabolismo esteróide, a esteróide sulfatase, que converte os sulfatos esteróides a estrona. Chegou-se inclusive à conclusão de que as concentrações do sulfato de estrona são 10 a 20 vezes superiores às concentrações de estrona e estradiol, obtidos através da aromatase. Para além disso, a expressão da STS é detetada em 90% dos tumores enquanto que apenas 60 a 70% de tumores expressam a aromatase. Tendo por base estas duas evidências, tornou-se claro a importância do desenvolvimento de terapias visando a inibição das STS. Até à data apenas um composto conseguiu entrar em dois ensaios clínicos, o que demonstra que é uma área ainda com pouco desenvolvimento e que necessita de investigação adicional para validar estes compostos. Apesar de os resultados do composto Irosustat em ensaios clínicos de fase 1 terem sido encorajadores, são necessários mais estudos clínicos antes do uso generalizado destes compostos.

No futuro, a direção a seguir na terapêutica do cancro da mama poderá passar por compostos *multitarget*, de forma a maximizar a potência e eficácia e a diminuir as interações e efeitos adversos obtidos pela terapêutica única. Na sequência da pesquisa e revisão destes compostos, foi possível observar que estão em desenvolvimento inibidores duplos da aromatase e da esteróide sulfatase, inibidores duplos da STS e moduladores seletivos dos recetores de estrogénio e inibidores duplos da 17 β -HSD1 e STS, sem no entanto terem entrado em ensaios clínicos por agora.

Concluindo, confirma-se a necessidade de ampliar os estudos científicos sobre novas terapêuticas, através do aumento do número de ensaios clínicos e estudos sobre estrutura atividade, de forma a permitir a implementação do uso clínico destes novos compostos. Em suma, parece evidente que a abordagem *multitarget* assume um papel promissor para o tratamento do cancro da mama hormono-dependente, bem como o desenvolvimento de novos compostos mais específicos, inibindo diferentes enzimas implicadas na biossíntese dos estrogénios.

Referências Bibliográficas

1. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*. 2015;136:E359–86.
2. Benson JR, Jatoi I, Keisch M, Esteva FJ, Makris A, Jordan VC. Early breast cancer. *Lancet*. 2009;373:1463–79.
3. Miranda N, Portugal C. Doenças Oncológicas em Números 2015 - Programa Nacional para as Doenças Oncológicas. 2016;5–65.
4. Bastos J, Barros H, Lunet N. Evolução da mortalidade por cancro da mama em Portugal (1955-2002). *Acta Med Port*. 2007;20:139–44.
5. Singletary SE. Rating the risk factors for breast cancer. *Ann Surg*. 2003;237:474–82.
6. Narod SA. Clinical implications of the breast cancer susceptibility genes BRCA1 and BRCA2. *Womens Heal (L Engl)*. 2005;1:27–34.
7. Yoshida K, Miki Y. Role of BRCA1 and BRCA2 as regulators of DNA repair, transcription, and cell cycle in response to DNA damage. *Cancer Sci*. 2004;95:866–71.
8. Colditz GA. Breast Cancer Epidemiology and Risk Factors. 2014;54:96–102.
9. Yue W, Wang J-P, Li Y, Fan P, Liu G, Zhang N, et al. Effects of estrogen on breast cancer development: Role of estrogen receptor independent mechanisms. *Int J cancer*. 2010;127:1748–57.
10. Subramanian A, Salhab M, Mokbel K. Oestrogen producing enzymes and mammary carcinogenesis: A review. *Breast Cancer Res Treat*. 2008;111:191–202.
11. Cui J, Shen Y, Li R. Estrogen synthesis and signaling pathways during aging: from periphery to brain. *Trends Mol Med*. 2013;19:197–209.
12. Labrie F, Bélanger A, Cusan L, Gomez JL, Candas B. Marked decline in serum concentrations of adrenal C19 sex steroid precursors and conjugated androgen metabolites during aging. *J Clin Endocrinol Metab*. 1997;82:2396–402.
13. Labrie F, Luu-The V, Labrie C, Simard J. DHEA and Its Transformation into Androgens and Estrogens in Peripheral Target Tissues: Intracrinology. *Front Neuroendocrinol*. 2001;22:185–212.

14. Simpson ER. Sources of estrogen and their importance. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2003;86:225–30.
15. Zhou Z, Qiao JX, Shetty A, Wu G, Huang Y, Davidson NE, et al. Regulation of estrogen receptor signaling in breast carcinogenesis and breast cancer therapy. *Cell Mol Life Sci.* 2013;71:1549.
16. Shao W, Brown M. Advances in estrogen receptor biology: prospects for improvements in targeted breast cancer therapy. *Breast Cancer Res.* 2004;6:39–52.
17. Jameera Begam A, Jubie S, Nanjan MJ. Estrogen receptor agonists/antagonists in breast cancer therapy: A critical review. *Bioorg Chem.* 2017;71:257–74.
18. Marino M, Galluzzo P, Ascenzi P. Estrogen signaling multiple pathways to impact gene transcription. *Curr Genomics.* 2006;7:497–508.
19. Zilli M, Grassadonia A, Tinari N, Di Giacobbe A, Gildetti S, Giampietro J, et al. Molecular mechanisms of endocrine resistance and their implication in the therapy of breast cancer. *Biochim Biophys Acta - Rev Cancer.* 2009 ;1795:62–81.
20. Zhou Z, Qiao JX, Shetty A, Wu G, Huang Y, Davidson NE, et al. Regulation of estrogen receptor signaling in breast carcinogenesis and breast cancer therapy. *Cell Mol Life Sci.* 2014;71:1549.
21. Schiff R, Massarweh S, Shou J, Osborne CK. Breast Cancer Endocrine Resistance. *Clin Cancer Res.* 2003;9:447S-54S.
22. Jones KL, Buzdar AU. A review of adjuvant hormonal therapy in breast cancer. *Endocr Relat Cancer.* 2004;11:391–406.
23. Rugo HS, Rumble RB, Burstein HJ. Endocrine Therapy for Hormone Receptor Positive Metastatic Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology Guideline Summary. *J Oncol Pract.* 2016;12:583–7.
24. Osborne CK, Schiff R. Aromatase inhibitors: Future directions. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2005;95:183–7.
25. Dixon JM, M. J. Endocrine Resistance in Breast Cancer. *New Journal of Science.* 2014; vol. 2014:1–27.
26. Osborne CK, Schiff R. Mechanisms of Endocrine Resistance in Breast Cancer. *Annu Rev Med.* 2011;62:233–47.
27. Adamo V, Iorfida M, Montalto E, Festa V, Garipoli C, Scimone A, et al. Overview

- and new strategies in metastatic breast cancer (MBC) for treatment of tamoxifen-resistant patients. *Ann Oncol.* 2007 ;18:vi53-vi57.
28. Lee W-L, Cheng M-H, Chao H-T, Wang P-H. The Role of Selective Estrogen Receptor Modulators on Breast Cancer: From Tamoxifen to Raloxifene. *Taiwan J Obstet Gynecol.* 2008 ;47:24–31.
 29. Curran M, Wiseman L. Fulvestrant. *Drugs.* 2001;61(6):807–13; discussion 814.
 30. Kabos P, Borges VF. Fulvestrant: a unique antiendocrine agent for estrogen-sensitive breast cancer. *Expert Opin Pharmacother.* 2010 ;11:807–16.
 31. Parton M, Dowsett M, Smith I. Studies of apoptosis in breast cancer. *BMJ.* 2001 Jun 23;322(7301):1528–32.
 32. Jain K, Paranandi KS, Sridharan S, Basu A. Autophagy in breast cancer and its implications for therapy. *Am J Cancer Res.* 2013;3:251–65.
 33. Riggins RB, Bouton AH, Liu MC, Clarke R. Antiestrogens, Aromatase Inhibitors, and Apoptosis in Breast Cancer. In: *Vitamins and hormones.* 2005. p. 201–37.
 34. Bursch W, Karwan A, Mayer M, Dornetshuber J, Fröhwein U, Schulte-Hermann R, et al. Cell death and autophagy: Cytokines, drugs, and nutritional factors. *Toxicology.* 2008 ;254:147–57.
 35. Amaral C, Borges M, Melo S, Silva ET da, Correia-da-Silva G, Teixeira N. Apoptosis and Autophagy in Breast Cancer Cells following Exemestane Treatment. Chellappan SP, editor. *PLoS One.* 2012 ;7:e42398.
 36. Hong Y, Li H, Yuan Y-C, Chen S. Molecular characterization of aromatase. *Ann N Y Acad Sci.* 2009 ;1155:112–20.
 37. Ghosh D, Griswold J, Erman M, Pangborn W. Structural basis for androgen specificity and oestrogen synthesis in human aromatase. *Nature.* 2009 ;457:219–23.
 38. Bulun SE, Lin Z, Imir G, Amin S, Demura M, Yilmaz B, et al. Regulation of Aromatase Expression in Estrogen-Responsive Breast and Uterine Disease: From Bench to Treatment. *Pharmacol Rev.* 2005;57:359-83.
 39. Miller WR, Anderson TJ, Jack WJ. Relationship between tumour aromatase activity, tumour characteristics and response to therapy. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 1990 ;37:1055–9.
 40. Bulun SE, Simpson ER. Breast cancer and expression of aromatase in breast adipose tissue. *Trends Endocrinol Metab.* 1994 ;5:113–20.

41. Jordan VC, Brodie AMH. Development and evolution of therapies targeted to the estrogen receptor for the treatment and prevention of breast cancer. *Steroids*. 2007;72:7–25.
42. Yadav MR, Barmade MA, Tamboli RS, Murumkar PR. Developing steroidal aromatase inhibitors-an effective armament to win the battle against breast cancer. *Eur J Med Chem*. 2015 ;105:1–38.
43. Yanase T, Mu YM, Nishi Y, Goto K, Nomura M, Okabe T, et al. Regulation of aromatase by nuclear receptors. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2001 ;79:187–92.
44. Chen D, Reierstad S, Lu M, Lin Z, Ishikawa H, Bulun SE. Regulation of breast cancer-associated aromatase promoters. *Cancer Lett*. 2009 ;273:15–27.
45. Hong Y, Rashid R, Chen S. Binding features of steroidal and nonsteroidal inhibitors. *Steroids*. 2011;76:802–6.
46. Nabholz JM, Glogorov J, Prentice RL, Al. E, Thurlimann B. Aromatase inhibitors in the management of early breast cancer. *Eur J Surg Oncol*. 2008;34:1199–207.
47. Fabian CJ. The what, why and how of aromatase inhibitors: hormonal agents for treatment and prevention of breast cancer. *Int J Clin Pract*. 2007;61:2051–63.
48. Smith IE, Dowsett M. Aromatase Inhibitors in Breast Cancer. Wood AJJ, editor. *N Engl J Med*. 2003;348:2431–42.
49. Miller W. Biological rationale for endocrine therapy in breast cancer. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2004;18:1–32.
50. Lønning PE, Eikesdal HP. Aromatase inhibition 2013: clinical state of the art and questions that remain to be solved. *Endocr Relat Cancer*. 2013;20:R183-201.
51. Nabholz J-MA. Long-term safety of aromatase inhibitors in the treatment of breast cancer. *Ther Clin Risk Manag*. 2008 ;4:189–204.
52. Miller WR, Larionov AA. Understanding the mechanisms of aromatase inhibitor resistance. *Breast Cancer Res*. 2012;14:201.
53. Berry J. Are all aromatase inhibitors the same? A review of controlled clinical trials in breast cancer. *Clin Ther*. 2005;27:1671–84.
54. Geisler J, Lønning PE. Aromatase Inhibition: Translation into a Successful Therapeutic Approach. *Clin Cancer Res*. 2005;11:2809-21.

55. Miller WR, Bartlett J, Brodie AMH, Brueggemeier RW, di Salle E, Lønning PE, et al. Aromatase inhibitors: are there differences between steroidal and nonsteroidal aromatase inhibitors and do they matter? *Oncologist*. 2008;13:829–37.
56. Geisler J, Haynes B, Anker G, Dowsett M, Lønning PE. Influence of Letrozole and Anastrozole on Total Body Aromatization and Plasma Estrogen Levels in Postmenopausal Breast Cancer Patients Evaluated in a Randomized, Cross-Over Study. *J Clin Oncol*. 2002;20:751–7.
57. Dixon JM, Renshaw L, Young O, Murray J, Macaskill EJ, McHugh M, et al. Letrozole Suppresses Plasma Estradiol and Estrone Sulphate More Completely Than Anastrozole in Postmenopausal Women With Breast Cancer. *J Clin Oncol*. 2008;26:1671–6.
58. Smith I, Yardley D, Burris H, De Boer R, Amadori D, McIntyre K, et al. Comparative Efficacy and Safety of Adjuvant Letrozole Versus Anastrozole in Postmenopausal Patients With Hormone Receptor–Positive, Node-Positive Early Breast Cancer: Final Results of the Randomized Phase III Femara Versus Anastrozole Clinical Evaluation . *J Clin Oncol*. 2017;35:1041–8.
59. Lombardi P. Exemestane, a new steroidal aromatase inhibitor of clinical relevance. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis*. 2002;1587:326–37.
60. Ahmad I, Shagufta. Recent developments in steroidal and nonsteroidal aromatase inhibitors for the chemoprevention of estrogen-dependent breast cancer. *Eur J Med Chem*. 2015;102:375–86.
61. Geisler J, Sasano H, Chen S, Purohit A. Steroid sulfatase inhibitors: Promising new tools for breast cancer therapy? *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2011;125:39–45.
62. Stanway SJ, Delavault P, Purohit A, Woo LWL, Thurieau C, Potter BVL, et al. Steroid Sulfatase: A New Target for the Endocrine Therapy of Breast Cancer. *Oncologist*. 2007;12:370–4.
63. Rižner TL. The Important Roles of Steroid Sulfatase and Sulfotransferases in Gynecological Diseases. *Front Pharmacol*. 2016;7:30-3.
64. Billich A, Nussbaumer P, Lehr P. Stimulation of MCF-7 breast cancer cell proliferation by estrone sulfate and dehydroepiandrosterone sulfate: inhibition by novel non-steroidal steroid sulfatase inhibitors. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 73:225–35.

65. Williams SJ. Sulfatase inhibitors: a patent review. *Expert Opin Ther Pat.* 2013;23:79–98.
66. Palmieri C, Stein RC, Liu X, Hudson E, Nicholas H, Sasano H, et al. IRIS study: a phase II study of the steroid sulfatase inhibitor Irosustat when added to an aromatase inhibitor in ER-positive breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat.* 2017;165:343–53.
67. Sadozai H. Steroid sulfatase inhibitors: promising new therapy for breast cancer. *J Pak Med Assoc.* 2013;63:509–15.
68. Foster PA, Newman SP, Chander SK, Stengel C, Jhalli R, Woo LLW, et al. In vivo Efficacy of STX213, A Second-Generation Steroid Sulfatase Inhibitor, for Hormone-Dependent Breast Cancer Therapy. *Clin Cancer Res.* 2006;12:5543–9.
69. Foster PA, Chander SK, Parsons MFC, Newman SP, Woo LWL, Potter BVL, et al. Efficacy of three potent steroid sulfatase inhibitors: pre-clinical investigations for their use in the treatment of hormone-dependent breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2008;111:129–38.
70. Woo LWL, Fischer DS, Sharland CM, Trusselle M, Foster PA, Chander SK, et al. Anticancer steroid sulfatase inhibitors: synthesis of a potent fluorinated second-generation agent, in vitro and in vivo activities, molecular modeling, and protein crystallography. *Mol Cancer Ther.* 2008;7:2435–44.
71. Ishida H, Nakata T, Sato N, Li P-K, Kuwabara T, Akinaga S. Inhibition of steroid sulfatase activity and cell proliferation in ZR-75-1 and BT-474 human breast cancer cells by KW-2581 in vitro and in vivo. *Breast Cancer Res Treat.* 2007;104:211–9.
72. Purohit A, Foster PA. Steroid sulfatase inhibitors for estrogen- and androgen-dependent cancers. *J Endocrinol.* 2012;212:99–110.
73. Wood PM, Woo LWL, Thomas MP, Mahon MF, Purohit A, Potter BVL. Aromatase and Dual Aromatase-Steroid Sulfatase Inhibitors from the Letrozole and Vorozole Templates. *ChemMedChem.* 2011;6:1423–38.
74. Foster PA, Chander SK, Newman SP, Woo LWL, Sutcliffe OB, Bubert C, et al. A New Therapeutic Strategy against Hormone-Dependent Breast Cancer: The Preclinical Development of a Dual Aromatase and Sulfatase Inhibitor. *Clin Cancer Res.* 2008;14:6469–77.

75. Rasmussen LM, Zaveri NT, Stenvang J, Peters RH, Lykkesfeldt AE. A novel dual-target steroid sulfatase inhibitor and antiestrogen: SR 16157, a promising agent for the therapy of breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2007;106:191–203.
76. Salah M, Abdelsamie AS, Frotscher M. First Dual Inhibitors of Steroid Sulfatase (STS) and 17 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 1 (17 β -HSD1): Designed Multiple Ligands as Novel Potential Therapeutics for Estrogen-Dependent Diseases. *J Med Chem.* 2017;60:4086–92.
77. Veronesi U, Boyle P, Goldhirsch A, Orecchia R, Viale G. Breast cancer. *Lancet.* 2005;365:1727–41.
78. Pepe, G, Albrecht E. The global library of women's medicine. Sapiens Global Library; 2008.
79. Johnston SRD. Endocrinology and hormone therapy in breast cancer: selective oestrogen receptor modulators and downregulators for breast cancer - have they lost their way? *Breast Cancer Res.* 2005;7:119–30.
80. Biegón A, Alia-Klein N, Fowler JS. Potential contribution of aromatase inhibition to the effects of nicotine and related compounds on the brain. *Front Pharmacol.* 2012;3:185-40.